

УДК 612.617.1:615.014.41:539.21-022.532

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

Кріоконсервування сім'яних канальців щурів із застосуванням біополімерів та повільного неконтрольованого охолодження

UDC 612.617.1:615.014.41:539.21-022.532

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

Cryopreservation of Rat Seminiferous Tubules Using Biopolymers and Slow Non-Controlled Rate Cooling

Реферат: Одним із сучасних напрямків медико-біологічних досліджень є застосування новітніх біоматеріалів і кріобіологічних технологій з метою збереження фертильності, особливо за необхідності проведення цитотоксичної терапії. Існуючі протоколи кріоконсервування тестикулярної тканини потребують подальшої оптимізації та удосконалення. У роботі проведено порівняльну оцінку впливу біополімерів (бичачий сироватковий альбумін, колагеновий і фібриновий гелі) в комбінації з 0,6 М диметилсульфоксидом або 0,7 М глицерином на морфофункціональні характеристики сім'яних канальців статевонезрілих щурів після кріоконсервування з використанням повільної неконтрольованої швидкості охолодження до -70°C впродовж 40 хв та наступним зануренням зразків у рідкий азот. На основі результатів аналізу показників життєздатності, загальної активності лактатдегідрогенази, МТТ-тесту та гістоморфометричних даних (ступінь ретракції клітин, частота десквамації епітелію, кількість клітин із конденсованим ядром, наявність дефектів сперматогенного шару) встановлено, що найбільш оптимальним із усіх досліджених комбінацій біополімерів та кріопротекторів було поєднання фібринового гелю з 0,7 М глицерином. Отримані дані можуть використовуватися для обґрунтування та розробки ефективних методик кріоконсервування сім'яних канальців людини з використанням біополімерів.

Ключові слова: сім'яні канальця, статевонезрілі щури, кріопротектори, бичачий сироватковий альбумін, колагеновий гель, фібриновий гель.

Реферат: Одним из современных направлений медико-биологических исследований является применение новейших биоматериалов и криобиологических технологий с целью сохранения фертильности, особенно при необходимости проведения цитотоксической терапии. Существующие протоколы криоконсервирования тестикулярной ткани нуждаются в дальнейшей оптимизации и усовершенствовании. В работе проведена сравнительная оценка влияния биополимеров (бычий сывороточный альбумин, коллагеновый и фибриновый гели) в комбинации с 0,6 М диметилсульфоксидом или 0,7 М глицерином на морфофункциональные характеристики семенных канальцев неполовозрелых крыс после криоконсервирования с использованием медленной неконтролируемой скорости охлаждения до -70°C в течение 40 мин и последующего погружения образцов в жидкий азот. На основе результатов анализа показателей жизнеспособности, общей активности лактатдегидрогеназы, МТТ-теста и гистоморфометрических показателей (степень ретракции клеток, частота десквамации эпителия, количество клеток с конденсированным ядром, наличие дефектов сперматогенного слоя) установлено, что наиболее оптимальным из всех исследованных комбинаций биополимеров и кріопротекторов было сочетание фибринового геля с 0,7 М глицерином. Полученные данные могут использоваться для обоснования и разработки эффективных методик криоконсервирования семенных канальцев человека с применением биополимеров.

Ключевые слова: семенные канальца, неполовозрелые крысы, кріопротекторы, бычий сывороточный альбумин, коллагеновый гель, фибриновий гель.

Abstract: One of the current trends in biomedical research is the use of novel biological products and cryotechniques to maintain fertility, especially in case of planned cytotoxic therapy. Existing protocols of testicular tissue cryopreservation require further optimization and improvement. This study represents a comparative evaluation of the effect of biopolymers (bovine serum albumin, collagen and fibrin gel) in combination with either 0.6 M dimethylsulfoxide or 0.7 M glycerol on morphofunctional characteristics of seminiferous tubules of immature rats after cryopreservation using slow non-controlled cooling down to -70°C for 40 min with following immersing the samples into liquid nitrogen. Based on the results of the analysis of viability, total activity of lactate dehydrogenase, MTT-test and histomorphometric data (cell retraction degree, epithelium desquamation frequency, number of cells with condensed nuclei, existing spermatogenic layer defects), the combination of the fibrin gel with a 0.7 M glycerol has been found to be the most optimal among all the studied combinations of biopolymers and cryoprotectants. The obtained data can be used for substantiation and development of effective cryopreservation methods for human seminiferous tubules using biopolymers.

Key words: seminiferous tubules, immature rats, cryoprotectors, bovine serum albumin, collagen gel, fibrin gel.

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

Надійшла 28.03.2018

Прийнята до друку 13.11.2018

Received March, 28, 2018

Accepted November, 13, 2018

© 2018 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.

Перспективним напрямком сучасних біотехнологій є використання кріобіологічних розробок у репродуктивній медицині, андрології та гінекології, зокрема для лікування безпліддя, захворювань статевих залоз, а також для пренатальної корекції аномалій розвитку плода [2, 10, 23, 25].

На сьогодні відомо два підходи до низькотемпературного зберігання тканини сім'яників: у вигляді суспензії клітин або фрагментів тканини розміром від 6 до 80 мм³ [2]. Вони є доцільними та безальтернативними для збереження фертильності хворих допубертатного віку, яким показана гонадотоксична терапія, оскільки сперматогенез у них ще не розвинений. У таких випадках основною метою кріозбереження тестикулярної тканини є її подальша аутогенна трансплантація для ініціації сперматогенезу *in vitro* або *in vivo* [14, 27]. Крім того, перспективним вважається використання сперматозоїдів, отриманих шляхом культивування тестикулярної тканини, для екстракорпорального запліднення [12].

Для кріоконсервування фрагментів незрілої тканини яєчка зазвичай застосовують програмне заморожування з низькими швидкостями охолодження. Існує декілька протоколів, які передбачають використання кріопротекторів ендо- і екзоцелюлярного типів та їх комбінацій [15, 17, 21]. Раніше було продемонстровано, що диметилсульфоксид (ДМСО), який має низьку молекулярну масу і швидко проникає в клітини, більшою мірою мінімізує кріоушкодження тестикулярної тканини у концентрації 0,7 М за умов програмного заморожування порівняно з 1,5 М 1,2-пропандіолом і 12% гліцерином, які, так само як і ДМСО, широко використовують у сучасних протоколах кріоконсервування [15, 18].

У попередніх наших дослідженнях було визначено, що морфологічні параметри та метаболічна активність клітин сім'яних каналців статевонезрілих щурів після інкубації у розчинах кріозахисних речовин залежать від концентрації кріопротекторів та часу їх експозиції у розчинах. 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 не знижувала метаболічну активність клітин порівняно з розчинами, які містили 50 г/л поліетиленоксиду-400 та 0,1 М сахарози [24]. У процесі кріоконсервування додатковими компонентами середовищ, які зменшують ступінь ушкодження клітин, можуть бути білкові домішки [13]. Показано, що використання фетальної телячої сироватки, бичачого сироваткового альбуміну, ре-

The prospective direction of contemporary biotechnology is the application of cryobiological approaches for reproductive medicine, andrology and gynecology, in particular for the treatment of infertility, genital diseases, as well as for prenatal correction of fetal abnormalities [3, 9, 23, 25].

To date, two approaches to low temperature storage of testicular tissue are known: either as a suspension of cells or as the tissue fragments sized from 6 to 80 mm³ [3]. They are expedient and non-alternative to preserve the fertility of adolescent patients, facing a gonadotoxic therapy, because of the absent spermatogenesis. In such cases, the primary purpose of testicular tissue cryopreservation is its further autologous transplantation to initiate spermatogenesis either *in vitro* or *in vivo* [13, 27]. As well, the use of spermatozoa obtained by testicular tissue culturing for extracorporeal fertilization is considered as a promising approach [11].

The programmable freezing with low cooling rates is usually used for cryopreservation of fragments of immature testicular tissue. There are several protocols, suggesting the use of cryoprotectants of endo- and exocellular types and their combinations [15, 17, 21]. It has been previously demonstrated that dimethylsulfoxide (DMSO), being a low molecular weight substance and rapidly penetrating into cells, at a concentration of 0.7 M minimizes to a greater extent a cryolesion of testicular tissue undergoing programmable freezing if compared to 1.5 M 1,2-propanediol and 12% glycerol, which, like DMSO, are also widely used in conventional cryopreservation protocols [15, 17].

In our previous studies, it has been found that the morphological parameters and metabolic activity of the immature rat seminiferous tubule cells subjected to incubation in the solutions of cryoprotective substances depended on the concentration of cryoprotectants and their incubation time in solutions. The thirty minute long incubation of the tissue samples in Hank's solution supplemented with 50 g/l bovine serum albumin and either with 0.6 M DMSO or 0.7 M glycerol was found as not causing a damage to the spermatogenic epithelium and not decreasing the metabolic activity of cells compared with solutions which contained 50 g/l polyethylene oxide-400 and 0.1M sucrose [24]. During freeze-thawing the injury level in the cells may be effectively decreased by several additional components of media, *e. g.*, protein additives [12]. It has been shown that the introduction of fetal bovine serum, bovine serum albumin, recombinant protein in cryoprotective media increases the viability of cells after freezing-thawing [7, 12]. It should be noted that supplementing cryoprotective media with xenoge-



комбінантного протеїну у складі кріозахисних середовищ підвищує життєздатність клітин після заморожування-відігріву [8, 13]. Слід зазначити, що додавання до кріозахисних середовищ ксеногенної сироватки може призводити до контамінації вірусами. Однак у більшості існуючих протоколів кріоконсервування тканин сім'яників у якості білкової складової застосовують сироватковий альбумін [15, 21].

Одним із шляхів вирішення зазначеної проблеми є використання альтернативного матеріалу – біополімерів, зокрема колагенового та фібринового гелів, що не мають імуногенних властивостей та можуть піддаватися стерилізації. Так, у 1990 р. H.G. Koebe [16] повідомив, що кріоконсервування гепатоцитів у двошаровому колагеновому носії значно підвищує їх функціональну активність. У дослідженнях A.L. Allenspach [4] показано, що розподіл води і структура кристалів льоду у колагеновому гелі залежать від його складу і швидкості заморожування.

На сьогодні в регенеративній медицині фібринові гелі широко використовуються як альтернатива колагеновим. Так, продукти, одержані з аутологічної крові, застосовують для відновлення пошкоджених тканин та органів. Однією з важливих властивостей фібринового гелю є здатність до контрольованого розпаду та самоорганізації в полімерну систему. До того ж фібриновий гель, як й інші похідні крові (сироватка, плазма), містить велику кількість різних речовин із протекторною дією в процесі кріоконсервування.

Таким чином, кріозахисне середовище з додаванням біополімерних гелів може виявити протекторну дію та впливати на структуру льоду, який утворюється на етапах охолодження, а отже, і на кінцевий результат кріоконсервування тканини. Однак ефективність застосування колагенового та фібринового гелів для кріоконсервування тканин або клітин сім'яників на сьогодні майже не досліджено.

Мета роботи – проведення порівняльного дослідження впливу біополімерів (бичачий сироватковий альбумін, фібриновий та колагеновий гелі) на морфофункціональні характеристики сім'яних каналців щурів після кріоконсервування з повільною неконтрольованою швидкістю охолодження.

Матеріали та методи

Усі маніпуляції з тваринами проводили згідно з міжнародними біоетичними нормами, законодавчими документами України, матеріалами IV Європейської конвенції з захисту хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей [9] та протоколом ко-

neic serum can lead to a viral contamination. Nevertheless, in most of the existing protocols for cryopreservation of testicular tissues, the serum albumin is used as a proteinous component [15, 21].

One way to solve this problem is to use the alternative substances, *i. e.* biopolymers, in particular collagen and fibrin gels, which do not demonstrate the immunogenic properties and the solutions of those can be sterilized. In particular, in 1990 H.G. Koebe [16] reported that cryopreservation of hepatocytes in a two-layer collagen carrier significantly increased their functional activity. In his studies A.L. Allenspach [1] demonstrated that the distribution of water and the structure of ice crystals in a collagen gel depended on its composition and freezing rate.

Nowadays the fibrin gels are widely used as an alternative to collagen in regenerative medicine. For example, the products derived from autologous blood are applied to repair the injured tissues and organs. One of the important properties of fibrin gel is the ability to control disintegration and self-organization into a polymeric system. In addition, the fibrin gel, like other derivatives of blood (serum, plasma), contains a large number of different substances with a protective effect during cryopreservation.

Thus, a cryoprotective medium complemented with biopolymer gels can reveal a protective effect and influence the structure of ice formed during the cooling, and hence the final result of cryopreservation of the tissue. However, application of collagen and fibrin gels for cryopreservation of tissues or testicular cells was scarcely studied.

The research purpose was to perform a comparative study of the effect of biopolymers (bovine serum albumin, fibrin and collagen gel) on morpho-functional characteristics of seminiferous tubules of rats after cryopreservation using low non-controlled cooling rates.

Materials and methods

All the manipulations with animals were carried out in accordance with international bioethical norms, legislative documents of Ukraine, statements of the IV European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes [8] as well as the protocol of the Committee in Bioethics of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine (№2014-02). The research was performed in immature male rats ($n = 50$) (50 ± 15) g and 7–8 weeks age [4].

Seminiferous tubules were derived from both testes of rats by a mechanical disruption. For further



мітету з біоетики Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (№2014-02). Роботу виконували на статевонезрілих щурах-самцях ($n = 50$) масою (50 ± 15) г і віком 7–8 тижнів [5].

Сім'яні каналця отримували з обох сім'яників щурів механічним шляхом. З одержаного матеріалу для подальших досліджень робили навіски масою (75 ± 3) мг і розмірами від 6 до 8 мм³.

Кріозахисні розчини виготовляли *ex tempore* на основі біополімерів:

1) бичачого сироваткового альбуміну (БСА) («РАА», Австрія), який використовували у концентрації 50 г/л у розчині Хенкса («РАА»);

2) колагенового гелю (КГ), який отримували із сухожилів хвостів щурів за стандартною методикою [6]. Значення рН доводили до нейтрального за допомогою 0,34N розчину NaOH;

3) фібринового гелю (ФГ), що виділяли зі свіжої аутологічної крові тварин, яку забирали з серцевої вени в об'ємі 5–7 мл та центрифугували протягом 12 хв зі швидкістю 1500g. Після центрифугування отримували три фракції крові: нижню – еритроцитарна маса; верхню – бідна тромбоцитами плазма; середню – збагачений тромбоцитами фібриновий гель. Зразки крові з ознаками гемолізу в експерименті не використовували.

Схему проведення експерименту наведено на рис. 1. До середовищ кріоконсервування (БСА, КГ, ФГ) додавали ДМСО («ПанЕко», Росія) або гліцерин («Dow Chemical», Німеччина) у кінцевих концентраціях 0,6 М та 0,7 М відповідно. Зразки було розподілено на експериментальні групи: БСА; БСА + 0,6 М ДМСО; БСА + 0,7 М гліцерин; КГ; КГ + 0,6 М ДМСО; КГ + 0,7 М гліцерин; ФГ; ФГ + 0,6 М ДМСО; ФГ + 0,7 М гліцерин та групи порівняння: інтактний контроль (свіжоізольовані фрагменти сім'яних каналців щурів) та негативний контроль (фрагменти сім'яних каналців щурів, які кріоконсервували у розчині Хенкса).

Час експозиції сім'яних каналців щурів у середовищах складав 30 хв при температурі 4°C із подальшим охолодженням. Отримані зразки (5 шт.) поміщали у кріопробірки об'ємом 1,8 мл («Nunc», США) з відповідними кріозахисними середовищами (1,5 мл). У випадках застосування КГ та ФГ фрагменти розташовувалися в кріоампулах вільно з проміжками приблизним розміром 1–2 мм. Зразки охолоджували в парах рідкого азоту до –70°C із неконтрольованою швидкістю впродовж 40 хв, далі їх переносили у рідкий азот (–196°C). Зразки зберігали в умовах кріобанку протягом місяця. Кріопробірки відігрівали на водяній бані при 40°C до появи рідкої фази, далі із зразків видаляли кріопротектори

studies we made the samples of (75 ± 3) mg weight and sized from 6 to 8 mm³.

Cryoprotective solutions were *ex tempore* prepared on the basis of biopolymer solutions:

1) bovine serum albumin (BSA) (PAA, Austria), which was used at a concentration of 50 g/L in Hanks solution (PAA);

2) collagen gel (CG), which was obtained from the tendon of rat tails according to the standard procedure [5]. The pH level was adjusted to neutral using 0.34 N NaOH solution;

3) fibrin gel (FG), isolated from fresh autologous blood of animals, procured from a cardiac vein in a volume of 5–7 ml and centrifuged for 12 min at a rate of 1500g. After centrifugation, three fractions of blood were received: lower – erythrocyte mass; upper – platelet-rich plasma; medium – fibrin gel enriched with thrombocytes. Samples of blood with the signs of hemolysis were not used in the experiment.

The scheme of experiment is shown in Fig. 1. Either DMSO (PanEco, Russia) or glycerol (Dow Chemical, Germany) at final concentrations of 0.6M and 0.7 M, respectively were added to biopolymer solutions (BSA, CG, FG). Samples were divided into experimental groups: BSA; BSA + 0.6 M DMSO; BSA + 0.7 M glycerol; CG; CG + 0.6 M DMSO; CG + 0.7 M glycerol; FG; FG + 0.6 M DMSO; FG + 0.7 M glycerol and the comparison groups: intact control (freshly isolated fragments of seminiferous tubules of rats) and negative control (fragments of rat seminiferous tubules, cryopreserved in Hank's solution).

The incubation time for rat seminiferous tubules in the media was 30 min at 4°C, followed by cooling. The obtained samples (5 pcs) were placed in a 1.8 ml (Nunc, USA) cryovials with appropriate cryopreservation media (1.5 ml). When applying the CG and FG the fragments were freely located in cryovials with the intervals of about 1–2 mm. The samples were cooled in vapors of liquid nitrogen down to –70°C without the control of cooling rate for 40 min, then they were transferred to liquid nitrogen (–196°C). The specimens were stored under cryobank conditions for a month. Cryovials were warmed up in a water bath at 40°C until a liquid phase appeared; then the cryoprotectants were removed from the samples by a three step change of the cryopreservation medium to Hank's solution.

The viability of cells was determined by supravital staining with Trypan blue in homogenates, which were mechanically obtained, with followed filtration of the suspension via a nylon filter [14].

The samples for histological examination were fixed in 10% formalin solution and after dehydration



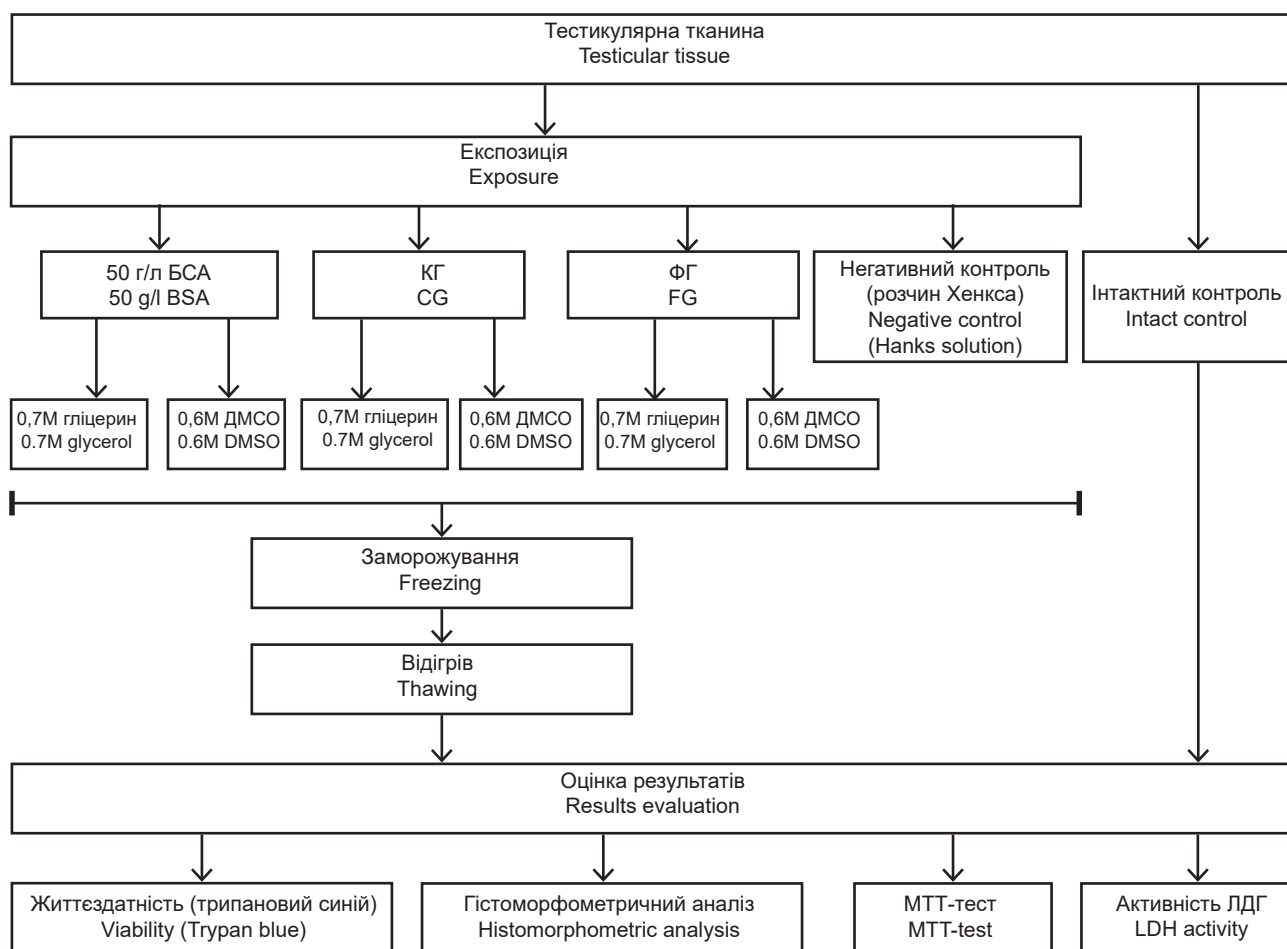


Рис. 1. Схема експерименту.
Fig. 1. Experimental scheme.

шляхом трьохетапної зміни середовища кріоконсервування на розчин Хенкса.

Життєздатність клітин визначали за методом суправітального забарвлення трипановим синім у гомогенатах, які отримували механічним шляхом із наступним пропусканням суспензії крізь нейлоновий фільтр [3].

Зразки для гістологічного дослідження фіксували в 10%-му розчині формаліну та після зневоднення й обезжирювання в ацетонах та спиртах наростаючої концентрації заливали парафіном. Отримували гістологічні зрізи товщиною 7 мкм, які забарвлювали гематоксилином і еозином та досліджували на мікроскопі Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Німеччина). Проводили загальну оцінку гістологічної структури сім'яних каналців щурів, оцінювали ступінь ретракції клітин, частоту десквамації епітелію, визначали кількість клітин із конденсованими ядрами та наявність дефектів сперматогенного шару (рис. 2).

Загальну активність лактатдегідрогенази (ЛДГ) у зразках сім'яних каналців щурів після кріо-

and degreasing in acetone and the alcohols of increasing concentrations were filled with paraffin. Histological sections of 7 μm thickness, stained with hematoxylin and eosin, were examined with microscope Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Germany). Histological structure of seminiferous tubules of rats was assessed, as well the degree of cell retraction, the frequency of desquamation of the epithelium signs, the number of cells with condensed nuclei and the presence of defects in the spermatogenic layer were determined (Fig. 2).

Total activity of lactate dehydrogenase (LDH) in samples of seminiferous tubules of rats after cryopreservation was measured using the LDH test kit (Phyllis-Diagnosis, Ukraine). For performing the test, the tissue samples were homogenized with subsequent 5-min centrifugation (1000g). The optical density in the supernatant was determined with photoelectrocolorimeter KFK-2-UHL42 (JSC Zagorsk Optical and Mechanical Plant, Russia) at a 365 nm wavelength. Activity of LDH was calculated according to the instruction.

консервування вимірювали за допомогою тест-набору реактивів «ЛДГ» («Філісіт-Діагностика», Україна). Для проведення тесту зразки тканин гомогенізували з наступним 5-хвилинним центрифугуванням (1000g). Оптичну щільність у супернатанті визначали на фотоелектрокалориметрі «КФК-2-УХЛ42» (ВАТ «Загорський оптико-механічний завод», Російська Федерація) при довжині хвилі 365 нм. Активність ЛДГ розраховували за інструкцією.

Для визначення метаболічної активності клітин використовували МТТ-тест [20]. Для його проведення зразки сім'яних канальців щурів після кріоконсервування переносили в 1 мл середовища Хенкса, в яке вносили по 0,5 мл розчину МТТ у концентрації 5 мг/мл. Через 3 години інкубації (5% CO₂, 37°C) середовище повністю видаляли і розчинювали утворений формазаан додаванням ДМСО (1 мл/зразок) із наступним 10-хвилинним центрифугуванням (1500g). Оптичну щільність розчину формазаану в супернатанті вимірювали на фотоелектрокалориметрі «КФК-2-УХЛ42» при довжині хвилі 540 нм.

Нормальність розподілу кількісних ознак визначали за спільним критерієм перевірки на симетричність і нульовим коефіцієнтом ексцесу. За умов нормального розподілу змінних значущість відмінностей між групами оцінювали за t-критерієм Стьюдента з використанням статистичних параметрів: *M* – середнє; *m* – стандартна помилка середнього; *n* – обсяг аналізованої групи; *p* – рівень значущості ($p < 0,05$). Для аналізу даних використовували пакети програм «Microsoft Excel» («Microsoft», США) та «Statistika 8» («Statsoft», США).

Результати та обговорення

Результати вивчення гістологічних препаратів показали, що сім'яні канальця статевонезрілих щурів інтактною групи на зрізах мали округлу або овальну форму (рис. 3, А). У середині сім'яних канальців на базальній мембрані в декілька шарів розташовувався сперматогенний епітелій, герміногенні клітини якого знаходилися на різних стадіях розвитку. У зовнішньому базальному шарі візуалізувалися сперматогонії – округлі клітини з гіперхромним ядром і тонким обідком цитоплазми. У внутрішньому адлюмінальному шарі в декілька рядів розташовувалися сперматоцити – клітини з великим ядром і широким обідком цитоплазми.

Кріоконсервування сім'яних канальців щурів без кріопротекторів (негативний контроль) викликало грубі гістоструктурні порушення (рис. 3, В). Відбувалася різка ретракція клітин сперматоген-

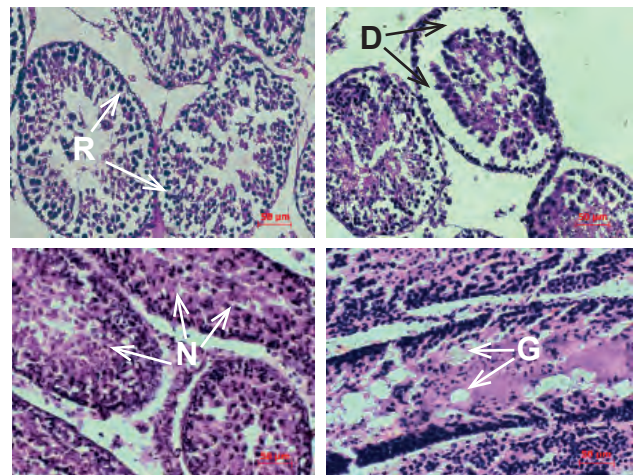


Рис. 2. Оцінка гістологічної структури сперматогенного епітелію сім'яних канальців статевонезрілих щурів. R – ретракція клітин, D – десквамація епітелію, N – конденсація ядер, G – утворення дефектів.

Fig. 2. Estimation of histological structure of spermatogenic epithelium of seminiferous tubules of sexually immature rats. R – cell retraction, D – desquamation of epithelium, N – condensation of nuclei, G – formation of defects.

To determine the metabolic activity of cells, the MTT test [20] was used. To perform it the samples of rat seminiferous tubules after cryopreservation were transferred to 1 ml Hank's medium, which was added with 0.5 ml MTT solution at a concentration of 5 mg/ml. After 3 hours of incubation (5% CO₂, 37°C), the medium was completely removed and the formed formazan was dissolved by addition of DMSO (1 ml/specimen) followed by 10-min centrifugation (1500g). The optical density of formazan solution in the supernatant was measured with a photoelectrocalorimeter KFK-2-UHL42 at 540 nm wavelength.

The normal distribution of quantitative attributes was determined by the general criterion of checking for symmetry and the zero coefficient of excess. In case of normal distribution of variables, the significance of differences between the groups was estimated with Student t-criterion using statistical parameters: *M* – mean; *m* – standard error of the average; *n* – volume of the analyzed group; *p* – the significance level ($p < 0.05$). To analyze the data the Microsoft Excel (Microsoft, USA) and Statistica 8 (Statsoft, USA) softwares were used.

Results and discussion

The findings of evaluation of histological preparations showed that the seminiferous tubules of immature rats of the intact group had a round or oval shape of the sections (Fig. 3A). Inside the seminiferous tubules the basement membrane was covered with several layers of spermatogenic epi-

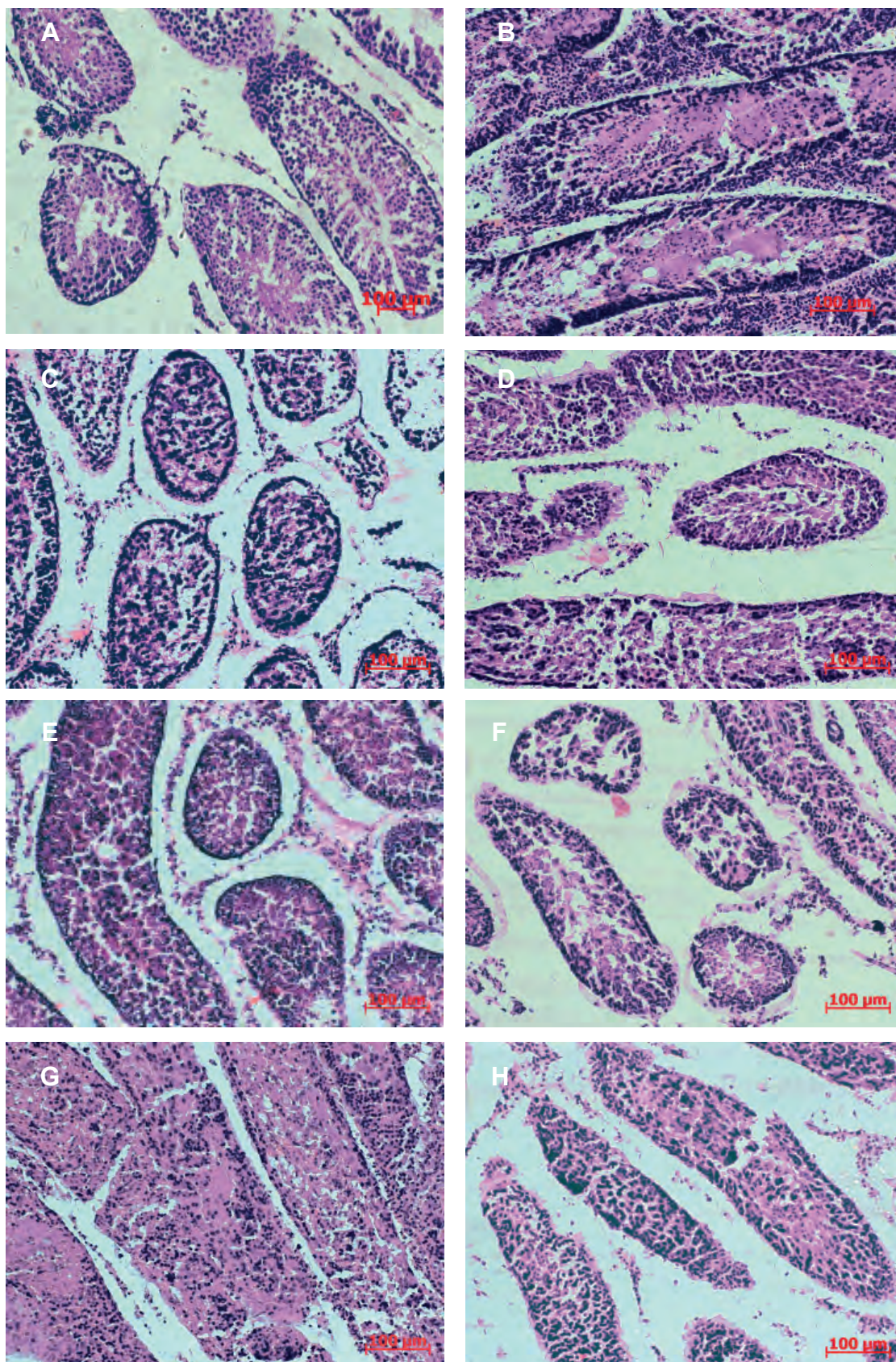


Рис. 3. Сім'яні канальця статевонезрілих щурів після кріоконсервування: **А** – інтактна тканина; **В** – негативний контроль; **С** – 0,6 М ДМСО + БСА; **Д** – 0,7 М гліцерин + БСА; **Е** – 0,6 М ДМСО + КГ; **Ф** – 0,7М гліцерин + КГ; **Г** – 0,6 М ДМСО + ФГ; **Н** – 0,7 М гліцерин + ФГ. Мікрофотографія, забарвлення гематоксилином та еозином.

Fig. 3. Seminiferous tubules of sexually immature rats after cryopreservation: **A** – intact tissue; **B** – negative control; **C** – 0.6 M DMSO + BSA; **D** – 0.7 M glycerol + BSA; **E** – 0.6 M DMSO + CG; **F** – 0.7 M glycerol + CG; **G** – 0.6 M DMSO + FG; **H** – 0.7 M glycerol + FG. Microphotos, hematoxylin and eosin staining.

ного епітелію з утворенням щілин. Всі ядра клітин набували округлої форми, а характерна для сперматогенного шару зональність була відсутня. У ядрах 67% клітин спостерігалися явища пікнозу. Десквамація епітелію, у тому числі тотальна, визначалася в 30% досліджених каналців. У даній групі препаратів виявлялися дефекти округлої форми, які мали розмір 7,5–30 мкм та чіткі рівні контури.

У зразках сім'яних каналців статевонезрілих щурів після кріоконсервування в середовищах на основі розчину Хенкса з БСА знижувався ступінь ретракції та десквамації клітин сперматогенного епітелію відносно негативного контролю. Цей ефект був більш вираженим у середовищах із додаванням 0,7 М гліцерину, ніж 0,6 М ДМСО. Крім того, в обох випадках зменшувалися кількість і розмір дефектів сферичної форми (рис. 3, С, D).

Середовища на основі КГ мали більшу протекторну дію, ніж розчин Хенкса з БСА, що проявлялося зменшенням ступеня ретракції та десквамації клітин сперматогенного епітелію. Проте в цих групах препаратів місцями відзначалися фрагментація та вакуолізація ядер, а в центральній частині каналців у ряді випадків візуалізувалися ділянки, охоплені каріолізисом (набряклі та слабозабарвлені гематоксиліном ядра без чітких контурів). Але слід зазначити, що вираженість цих явищ була менша після кріоконсервування сім'яних каналців під захистом комбінації КГ із 0,7 М гліцерином (рис. 3, Е, F).

Застосування ФГ, подібно КГ, знижувало ступінь ретракції клітин сперматогенного епітелію, а також зменшувало кількість і розмір сферичних порожнин в його товщі порівняно з БСА (рис. 3, G, F). Слід зазначити, що у середовищі на основі ФГ із 0,7 М гліцерином виявлявся більш виражений протективний ефект без фрагментації/лізису ядер клітин.

Таким чином, кріоконсервування сім'яних каналців статевонезрілих щурів із 0,7 М гліцерином та БСА мало більш виражену захисну дію на будову сперматогенного епітелію порівняно з застосуванням 0,6 М ДМСО у комбінації з БСА. У разі використання кріозахисних середовищ на основі ФГ та КГ у зразках після заморожування-відігріву зменшилися ступінь ретракції та десквамації, кількість та розмір дефектів сперматогенного епітелію порівняно з негативним контролем. До того ж введення ФГ перешкоджало розвитку некрозу клітин сперматогенного епітелію (зменшення кількості пікнотичних ядер) порівняно з негативним контролем.

Результати оцінки життєздатності клітин сперматогенного епітелію в тканинах сім'яних канал-

thelium, the germinogenic cells of which were at different stages of development. In the external basal layer the spermatogonia, *i. e.* rounded cells with a hyperchromic nucleus and a thin rim of cytoplasm were visualized. In the inner adluminal layer a block of spermatocytes, the cells with a large nucleus and a wide rim of cytoplasm, were located.

Freeze-thawing of seminiferous tubules of rats without cryoprotectants (negative control) caused strong damages in histological structure (Fig. 3B). There was a sharp retraction of cells of spermatogenic epithelium with the formation of cracks. All the nuclei of cells gained a rounded shape, and characteristic zones of spermatogenous layer was absent. In nuclei of 67% cells the pycnosis phenomena were observed. The epithelium desquamation, including total one, was found in 30% of the examined tubules. In this group of preparations, round-shaped defects were noted, which had a size of 7.5–30 microns and clear, smooth contours.

The samples of seminiferous tubules of immature rats after cryopreservation in the media based on Hank's solution with BSA were characterized with the reduced degrees of retraction and desquamation of spermatogenic epithelium cells in respect to a negative control. This effect was more pronounced in the media with 0.7 M glycerol comparing to 0.6 M DMSO. In addition, in both cases, the number and size of spherical defects decreased (Fig. 3C, D).

The CG-based media had a higher protective effect versus Hank's solution with BSA, which was manifested by a decreased retraction and desquamation of spermatogenic epithelium cells. However, fragmentation and vacuolization of nuclei were observed in some areas both after using 0.6 M DMSO and 0.7 glycerol. In the latter these phenomena were less manifested (Fig. 3E, F). In the central part of the tubules in some cases the sites with karyolysis (swollen and weakly stained with hematoxylin nuclei without clear contours) were found.

The use of FG, similar to CG, reduced the retraction of spermatogenic epithelium cells, and also decreased the number and size of spherical cavities inside the epithelium if compared to BSA (Fig. 3G, F). It should be noted that in the medium based on FG with 0.7 M glycerol a more pronounced protective effect was found with no cell fragmentation or lysis.

Thus, cryopreservation of seminiferous tubules of immature rats with 0.7 M glycerol and BSA had a more pronounced protective effect on the structure of spermatogenic epithelium if compared with the use of 0.6 M DMSO in combination with BSA. In the case of using cryoprotective media based on FG and CG in the samples after freezing-thawing, the



ців (тест включення трипанового синього) після кріоконсервування наведено на рис. 4. Отримані дані свідчать, що використання 0,6 М ДМСО у комбінації з БСА або ФГ збільшувало кількість клітин із неушкодженою мембраною в зразках відповідно у 2,9 та 2,5 рази відносно негативного контролю. У зразках, кріоконсервованих під захистом 0,7 М гліцерину та БСА, кількість таких клітин була у 2,1 рази більше, ніж у негативному контролі. Кріоконсервування в середовищі на основі ФГ з 0,7 М гліцерином підвищувало даний показник в 3,2 рази відносно негативного контролю. У випадку використання КГ (з ДМСО або гліцерином) показник життєздатності клітин був значуще вище негативного контролю, однак не досягав значень, отриманих після застосування відповідного кріопротектору у комбінації з БСА або ФГ. За результатами порівняльної оцінки показника життєздатності клітин у дослідних групах виявлено, що найвище значення було в зразках, кріоконсервованих із 0,7 М гліцерином у комбінації з ФГ. Однак навіть у цьому випадку він не досягав значень інтактного контролю.

Результати МТТ-тесту (рис. 5) показали, що в зразках, кріоконсервованих із 0,6 М ДМСО у комбінації з БСА або 0,6 М ДМСО з ФГ, метаболічна активність була відповідно вище в 3,1 та 2,8 рази порівняно з негативним контролем. За умови застосування КГ з 0,6 М ДМСО досліджуваний показник перевищував значення негативного конт-

degree of retraction and desquamation, the number and size of defects in the spermatogenic epithelium, if compared with negative control, was decreased. In addition, the application of FG prevented the development of necrosis of cells of the spermatogenic epithelium (reduced number of pyknotic nuclei) versus a negative control.

The results of assessment of the viability of spermatogenic epithelium cells in the tissues of the seminiferous tubules (trypan blue test) after cryopreservation are presented in Fig. 4. The obtained data indicate that the use of 0.6 M DMSO in combination with BSA or FG increased the number of cells with intact membrane in the samples, respectively, in 2.9 and 2.5 times versus a negative control. In the samples cryopreserved under the protection of 0.7 M glycerol and BSA, the number of these cells was in 2.1 times higher than in a negative control. Cryopreservation in the medium based on FG with 0.7 M glycerol increased this value in 3.2 times comparing to a negative control. In case of using the CG (with DMSO or glycerol), the cell viability was significantly higher than negative control, but not reaching the values, obtained after application of the corresponding cryoprotectant in combination with BSA or FG. Based on the results of comparative evaluation of the cell viability in the experimental groups, it was found that the highest value was observed in the samples cryopreserved with 0.7 M glycerol in combination with FG.

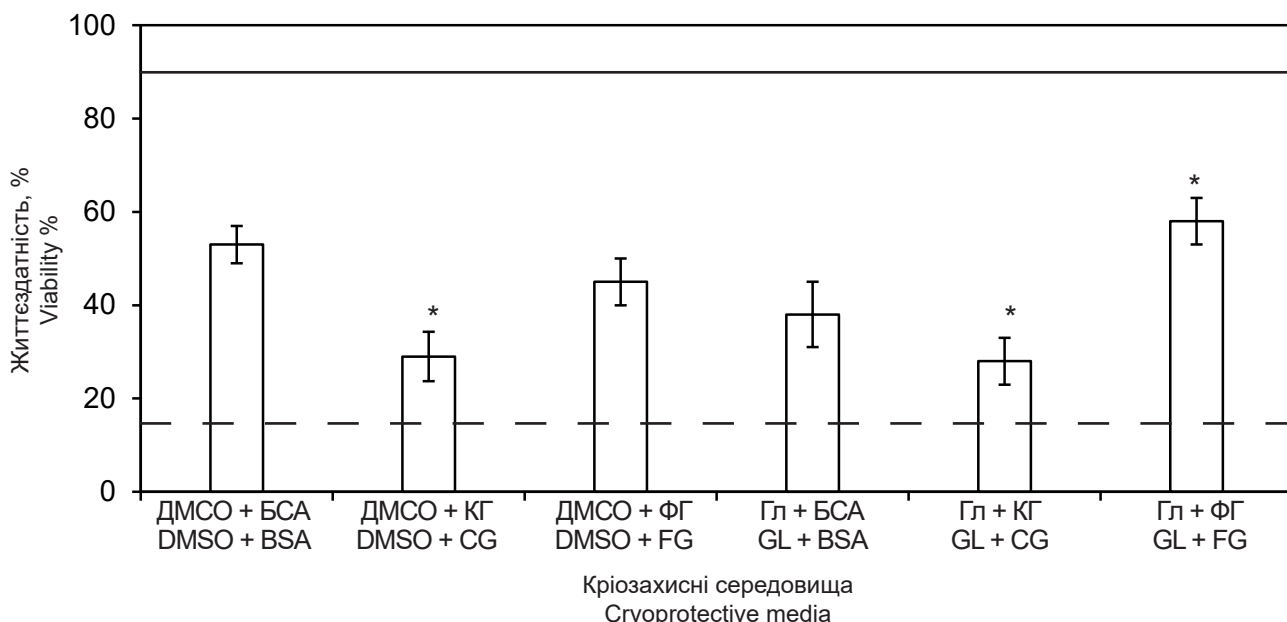


Рис. 4. Життєздатність клітин сперматогенного епітелію сім'яних каналців щурів після кріоконсервування. Гл – гліцерин; суцільна лінія – показник інтактного контролю; пунктирна лінія – показник негативного контролю; * – різниця значуща відносно відповідного кріопротектору у комбінації з БСА ($p < 0,05$; $n = 5$).

Fig. 4. Viability of cells of spermatogenic epithelium of seminiferous tubules of rats after cryopreservation. Gl – glycerol; solid line – index of intact control; dashed line – negative control index; * – difference is statistically significant versus corresponding cryoprotectant in combination with BSA ($p < 0.05$; $n = 5$).

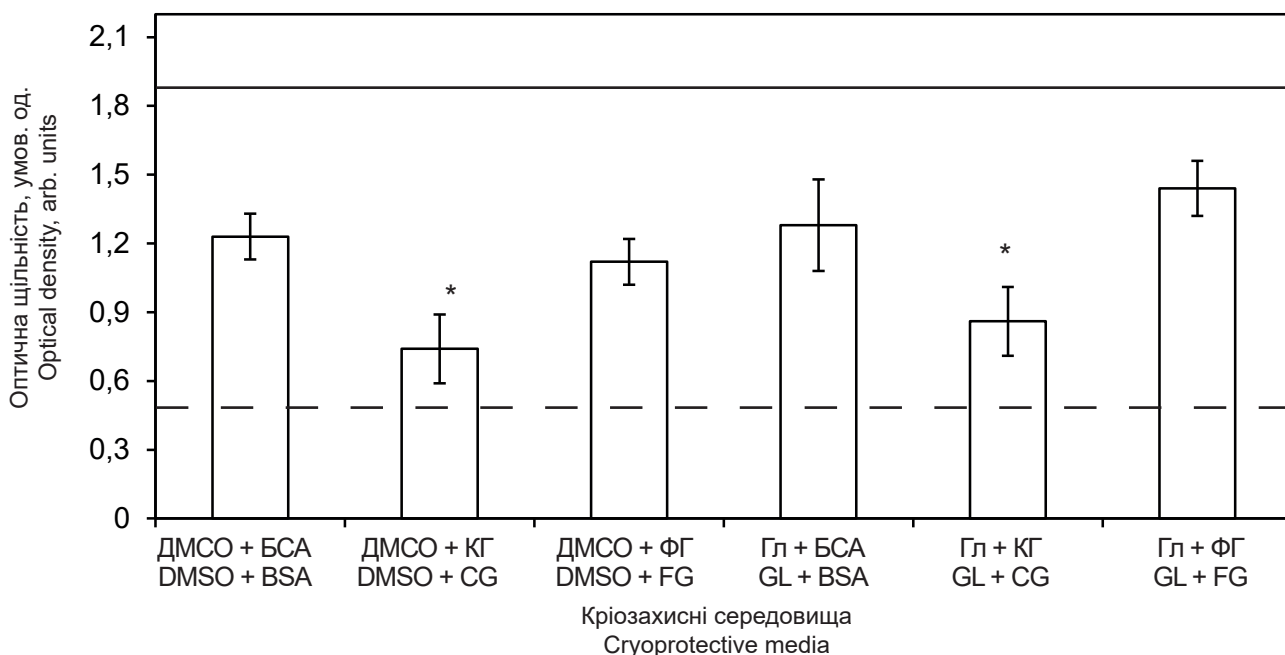


Рис. 5. Метаболічна активність (оптична щільність розчину формазану в МТТ-тесті) сім'яних каналців після кріоконсервування. Гл – гліцерин; суцільна лінія – показник інтактного контролю; пунктирна лінія – показник негативного контролю; * – різниця значуща відносно відповідного кріопротектору у комбінації з БСА ($p < 0,05$; $n = 5$).

Fig. 5. Metabolic activity (optical density of formazan solution in the MTT test) of seminiferous tubules after cryopreservation. Gl – glycerol; solid line – index of intact control; dashed line – negative control index; * – difference is statistically significant versus corresponding cryoprotectant in combination with BSA ($p < 0.05$; $n = 5$).

ролю в 1,8 раза, однак був в 1,7 раза нижче, ніж у зразках, кріоконсервованих під захистом 0,6 М ДМСО та БСА. У зразках, кріоконсервованих під захистом 0,7 М гліцерину з БСА та 0,7 М гліцерину разом з ФГ, результат МТТ-тесту був відповідно в 3,2 та 3,6 раза вище відносно негативного контролю. Даний показник у випадку комбінації КГ із 0,7 М гліцерином був у 2,2 раза вище порівняно із значеннями негативного контролю. Аналіз показав, що використання 0,7 М гліцерину з ФГ або БСА дозволяє зберегти найвищі показники метаболічної активності. Проте в усіх досліджених кріоконсервованих зразках метаболічна активність клітин залишалася значуще нижчою за інтактний контроль.

Результати дослідження впливу кріоконсервування на активність ЛДГ наведено на рис. 6. В усіх кріоконсервованих зразках активність ЛДГ була вище негативного контролю. Серед усіх комбінацій біополімерів із кріопротекторами цей показник мав найвище значення у випадку використання 0,7 М гліцерину з ФГ (він перевищував негативний контроль в 2,2 раза). В усіх досліджених кріоконсервованих зразках загальна активність ЛДГ була значуще нижча за інтактний контроль.

Аналіз отриманих даних свідчить, що метаболічна активність після заморожування-відігріву в усіх досліджених зразках сім'яних каналців

However, even in this case, it did not reach the values of intact control.

The MTT test results (Fig. 5) showed that in the samples cryopreserved either with 0.6 M DMSO in combination with BSA or 0.6 M DMSO with FG, metabolic activity was correspondingly higher in 3.1 and 2.8 times than negative control. If the CG with 0.6 M DMSO was used, the studied value exceeded the value of negative control by 1.8 times, but it was by 1.7 times lower than in the samples cryopreserved under the protection of 0.6 M DMSO and BSA. In the samples cryopreserved under protection of 0.7 M glycerol with BSA and 0.7 M glycerol with FG, the result of the MTT test was 3.2 and 3.6 times higher, respectively, versus a negative control. This index in the case of a combination of CG with 0.7 M glycerol was by 2.2 times higher if compared with the values of a negative control. The analysis showed that the use of 0.7 M glycerol with FG or BSA allowed the maintaining of the highest metabolic activity. However, in all cryopreserved samples examined, the metabolic activity of cells remained significantly lower than intact control.

The results of the effect of cryopreservation on LDH activity are shown in Fig. 6. In all cryopreserved samples the LDH activity was higher than negative control. Among all the combinations of biopolymers with cryoprotectants, this index was

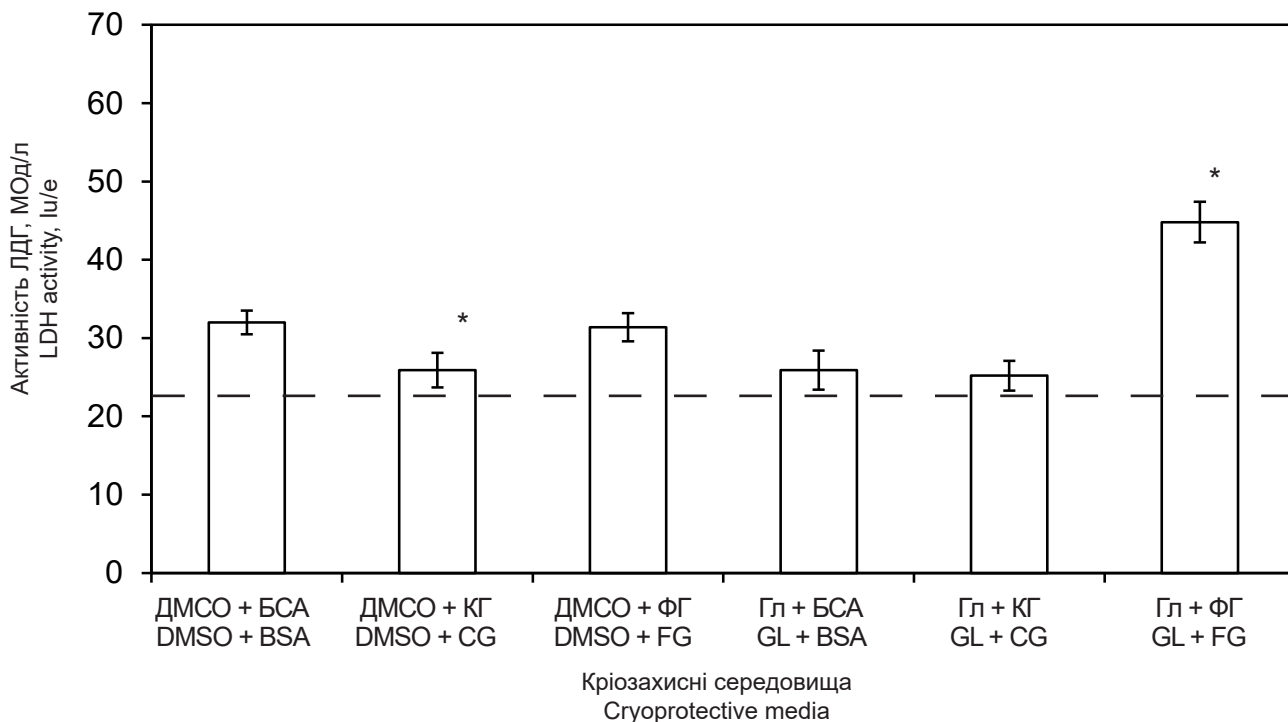


Рис. 6. Загальна активність ЛДГ у сім'яних канальцях статевонезрілих щурів після кріоконсервування. Гл – гліцерин; суцільна лінія – показник інтактного контролю; пунктирна лінія – показник негативного контролю; * – різниця значуща відносно відповідного кріопротектору у комбінації з БСА ($p < 0,05$; $n = 5$).

Fig. 6. Total activity of LDH in seminiferous tubules of sexually immature rats after cryopreservation. Gl – glycerol; solid line – index of intact control; dashed line – negative control index; * – difference is statistically significant versus corresponding cryoprotectant in combination with BSA ($p < 0.05$; $n = 5$).

статевонезрілих щурів знижувалася порівняно з інтактним контролем, але істотно перевищувала значення негативного контролю. Слід зазначити, що використання ФГ у комбінації з 0,7 М гліце-рином виявилось найбільш оптимальним з усіх досліджених комбінацій біополімерів та кріопротекторів. У цьому випадку знижувався ступінь ретракції клітин сперматогенного епітелію, зменшувались кількість і розмір сферичних порожнин в його товщі порівняно з комбінацією 0,7 М гліце-рину та БСА. Фібриновий гель на відміну від колагенового надавав більш вираженого протектив-ного ефекту, що проявлялося в зниженні кількості некротичних клітин у сперматогенному епітелію. За результатами МТТ-тесту комбіноване вико-ристання ФГ із 0,7 М гліце-рином забезпечувало найкраще збереження метаболічної активності клітин сім'яних канальців статевонезрілих щу-рів з усіх досліджених варіантів середовищ. Схо-жа тенденція спостерігалася щодо рівня загаль-ної активності ЛДГ.

Сучасні розробки інноваційних біоматеріалів внесли значний внесок у розвиток репродук-тивної медицини, особливо в аспекті збережен-ня фертильності. Наприклад, ФГ завдяки своїй біологічній природі забезпечує оптимальну під-тримку адгезії, проліферації, диференціювання

of the highest value when 0.7 M glycerol with FG was used (it exceeded the negative control by 2.2 times). For all the cryopreserved speci-mens analyzed, LDH activity was significantly lower than intact control.

The analysis of the data shows that the metabo-lic activity after freezing-thawing in all tested sam-ples of seminiferous tubules of immature rats decreased if compared to intact controls, but significantly exceeded the value of negative control. It should be noted that the use of FG in combination with 0.7 M glyce-rol was the most optimal among all the investigat-ed combinations of biopolymers and cryoprotectants. In this case, the degree of retraction of the spermatogenic epithelium cells decreased, the amount and size of the spherical cavities inside epithelium decreased in comparison with the combination of 0.7 M glyce-rol and BSA. Unlike collagen, the fibrin gel provided a more pronounced protective effect, which was manifested in reducing the number of necrotic cells in the spermatogenic epithelium. According to the results of the MTT test, the combined use of FG with 0.7 M glycerol provided the highest preservation of metabolic activity of the seminiferous tubule cells of immature rats among all the investigated variants of the media. A similar tendency was observed regarding the level of total activity of LDH.

та біохімічної сигналізації клітин. Він використовується для інкапсуляції фрагментів цілісної тканини або ізольованих клітин, для підтримки їх 3D-структури, а також для вивчення біологічних явищ, які були б неможливі в 2D-системах [7]. Важливо відзначити, що ФГ можна змішувати з різними факторами росту та ангіогенезу, які можуть бути доставлені контрольованим вивільненням для стимуляції неоангіогенезу і зменшення гіпоксичного пошкодження у випадку безсудинних трансплантацій. Результати експериментів *in vitro* показали, що ФГ властиві незначне пригнічення проліферації фібробластів та стимулюючий вплив на синтез колагену [19, 28].

Результати наших досліджень показали, що ФГ та гліцерин у процесі кріоконсервування мають адитивну ефективність завдяки різним механізмам кріозахисної дії. Під час повільного охолодження елементи тестикулярної тканини пошкоджуються як внутрішньоклітинними кристалами льоду, так і кристалами льоду, утвореними в екстрацелюлярному просторі. Гліцерин, що є ендоцелюлярним кріопротектором, проникаючи всередину клітин, знижує інтенсивність процесів кристалізації, зміщуючи їх у зону більш низьких температур. Біополімери через свою велику молекулярну масу не можуть проникнути всередину клітин. Проте їх використання у якості основи для кріозахисних середовищ обумовлено здатністю зменшувати кількість «вільної» води в екстрацелюлярному просторі, яка бере участь в утворенні кристалів льоду, що у свою чергу сприяє підвищенню стійкості тканини до переохолодження [4, 16]. До того ж відомо, що однією з характерних особливостей розчинів біополімерів є висока їх в'язкість, яка обернено залежить від температури. Тому біополімери у формі гелю здатні впливати на процеси кристалоутворення, сприяючи формуванню дрібнокристалічного льоду і таким чином зменшуючи його механічну дію на біоб'єкт. Така властивість гелів обумовлена збільшенням в'язкості середовища, що перешкоджає інтенсивному утворенню центрів кристалізації та гальмує ріст кристалів льоду в об'ємі [1].

Таким чином, для кріоконсервування фрагментів сім'яних каналців статевонезрілих щурів можна використовувати багатокомпонентні середовища, в яких класичний розчин БСА замінюється на біополімерні гелі. Обов'язковою умовою, яка забезпечує ефективність кріоконсервування, є наявність у складі цих середовищ ДМСО або гліцерину. Раніше було показано, що високомолекулярні полімери демонструють високі когезивні властивості, а отже чинять протекторну дію на біологічні об'єкти, знижуючи зовнішні концент-

Innovative biomaterials have significantly contributed to the development of reproductive medicine, especially in the aspect of fertility maintaining. For example, because of its biological nature, the FG provides an optimal support for adhesion, proliferation, differentiation and biochemical signaling of cells. It is used to encapsulate the fragments of integral tissue or single cells to support their 3D structure, as well as to study biological phenomena that would not be possible in 2D systems [6]. It is important to note that FG can be mixed with different growth and angiogenesis factors that can be released in a controlled way to stimulate neoangiogenesis and reduce hypoxic lesions in non-vascular transplants. The results of *in vitro* experiments showed that FG had a slight inhibitory effect on proliferation of fibroblasts and stimulated the collagen synthesis [19, 28].

The results of our studies have shown that FG and glycerol during cryopreservation have an additive effect due to different mechanisms of cryoprotective action. During slow cooling, the elements of the testicular tissue are damaged by intracellular ice crystals and the ones formed in an extracellular space. Glycerol, which is an endocellular cryoprotectant, penetrating into cells reduces the intensity of the crystallization processes, shifting them to a zone of lower temperatures. Because of their large molecular mass, biopolymers are not able to penetrate into cells. However, their use as a basis for cryoprotective media is due to the ability to reduce the amount of 'free' water in an extracellular space that participates in the formation of ice crystals, which in turn contributes to an increased tissue resistance to cooling [1, 16]. In addition, it is known that one of the features of biopolymer solutions is their high viscosity, reciprocally dependent on temperature. Therefore, biopolymers as gels can affect the crystal formation, contributing to the appearance of smaller ice crystals and thus reducing its mechanical action on biological object. Such a property of gels is stipulated with an increase in the viscosity of the medium, which impedes the intensive formation of crystallization nuclei and inhibits the growth of ice crystals in volume [2].

Thus, for the cryopreservation of seminiferous tubule fragments of the immature rats, it is possible to use multicomponent media in which the traditional BSA solution is replaced by biopolymer gels. A prerequisite for ensuring the effectiveness of cryopreservation is the presence of DMSO or glycerol. Previously, it was shown that the high molecular weight polymers exhibited high cohesive properties, and therefore have a protective impact on biological objects, reducing the extracellular



рації солі аналогічно низькомолекулярним кріопротекторам [11, 22]. R.J. Williams [26] висловив думку, що кріозахисна ефективність полімерів полягає в їх здатності змінювати фізичні властивості розчинів під час охолодження, а не безпосередньо захищати і змінювати характеристики клітинної мембрани. Можна припустити, що отримані в нашій роботі результати пояснюються тим фактом, що в процесі охолодження з повільними швидкостями висока в'язкість досліджених гелів сприяла частковій (або повній) вітрифікації позаклітинного середовища в зразках. Проте механізм криозахисної дії використаних біополімерних гелів недостатньо вивчено та потребує подальшого вивчення, що є перспективою для наших майбутніх досліджень.

Висновки

Застосування біополімерних гелів як складової кріозахисних середовищ дозволяє зберегти гістоструктуру та метаболічну активність клітин сперматогенного епітелію кріоконсервованих сім'яних каналців статевонезрілих щурів. Результати аналізу показників життєздатності, загальної активності ЛДГ, МТТ-тесту та гістоморфометричних досліджень свідчать, що найбільш оптимальним з усіх досліджених комбінацій біополімерів та кріопротекторів є поєднання фібринового гелю з 0,7 М гліцерином. Отримані результати можуть бути використані для розробки ефективних протоколів кріоконсервування сім'яних каналців з метою подальшої аутотрансплантації для ініціації сперматогенезу.

Література

1. Белоус АМ, Грищенко ВИ. Криобиология. Київ: Наукова думка, 1994. 428 с.
2. Быстрова ОВ, Калугина АС, Цыбатова ЕВ, и др. Способы восстановления фертильности у онкологических больных. Практическая онкология. 2009; 10(4): 245–53.
3. Кайдашева ИП. Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині. Полтава: Полімет; 2003. 320 с.
4. Allenspach AL, Kraemer TG. Ice crystal patterns in artificial gels of extracellular matrix molecules after quick-freezing and freeze-substitution. *Cryobiology*. 1989; 26(2): 170–9.
5. Champion SN, Carvallo FR, Chapin RE, et al. Comparative assessment of the timing of sexual maturation in male Wistar Han and Sprague-Dawley rats. *Reprod Toxicol*. 2013; 38(7): 16–24.
6. 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.
7. Chiti MC, Dolmans MM, Donnez J, Amorim CA. Fibrin in reproductive tissue engineering: a review on its application as a biomaterial for fertility preservation. *Annals of biomedical engineering*. 2017; 45(7): 1650–63.

salt concentrations similar to low molecular weight cryoprotectants [10, 22]. R.J. Williams [26] noted that the cryoprotective efficiency of polymers consisted in their ability to change the physical properties of solutions during cooling, but not to directly protect and change the characteristics of the cell membrane. We can assume that our findings are explained by the fact that during cooling with slow rates, the high viscosity of the investigated gels contributed to partial (or complete) vitrification of an extracellular medium in the samples. However, the mechanism of cryoprotective action of the used biopolymer gels has not been sufficiently studied and needs further research, which is the prospect of our next investigations.

Conclusions

The use of biopolymer gels as a component of cryoprotective media enabled the preservation of histological structure and metabolic activity of spermatogenic epithelial cells of cryopreserved seminiferous tubules of immature rats. The results of the analysis of viability, total activity of LDH, MTT-test and histomorphometric studies indicated that the combination of a 0.7 M glycerol with fibrin gel was the most optimal among all studied combinations of biopolymers and cryoprotectants. The results obtained can be used to develop effective cryopreservation protocols for seminiferous tubules with the aim of further autotransplantation to initiate spermatogenesis.

References

1. Allenspach AL, Kraemer TG. Ice crystal patterns in artificial gels of extracellular matrix molecules after quick-freezing and freeze-substitution. *Cryobiology*. 1989; 26(2): 170–9.
2. Belous AM, Gricshenko VI. [Cryobiology]. Kiev: Naukova dumka, 1994. 428 p. Russian.
3. Bystrova OV, Kalugina AS, Tsybatova EV, et al. [Methods for recovering fertility in cancer patients]. *Prakt Onkologiya*. 2009; 10(4): 245–53. Russian.
4. Champion SN, Carvallo FR, Chapin RE, et al. Comparative assessment of the timing of sexual maturation in male Wistar Han and Sprague-Dawley rats. *Reprod Toxicol*. 2013; 38(7): 16–24.
5. 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.
6. Chiti MC, Dolmans MM, Donnez J, Amorim CA. Fibrin in reproductive tissue engineering: a review on its application as a biomaterial for fertility preservation. *Annals of biomedical engineering*. 2017; 45(7): 1650–63.
7. Dimasi L. Meeting increased demands on cell-based processes by using defined media supplements. *BioProcess International*. 2011; 9(8): 48–58.



8. Dimasi L. Meeting increased demands on cell-based processes by using defined media supplements. *BioProcess International*. 2011; 9(8): 48–58.
9. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes. European Treaty Series No. 123 Strasbourg, 18.III.1986. Strasbourg: Council of Europe; 1986. 53p. [Cited 01.02.2018] Available from: <https://rm.coe.int/CoERMPublicCommonSearchServices/DisplayDCTMContent?documentId=090000168007a67b>.
10. 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; 27(1): 75–80. [Cited 01.02.2018] Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1472648313001296?via%3Dihub>.
11. Farrant J. Is there a common mechanism of protection of living cells by polyvinylpyrrolidone and glycerol during freezing? *Nature*. 1969; 222: 1175–6.
12. Ginsburg ES, Yanushpolsky EH, Jackson KV. In vitro fertilization for cancer patients and survivors. *Fertility and Sterility*. 2001; 75(4): 705–10.
13. Grill G, Porcellini A, Lucarelli G. Role of serum on cryopreservation and subsequent viability of mouse bone marrow hemopoetic stem cells. *Cryobiology*. 1980; 17(5): 516–20.
14. Jahnukainen K, Ehmcke J, Soder O, et al. Clinical potential and putative risks of fertility preservation in children utilizing gonadal tissue or germline stem cells. *Pediatr Res*. 2006; 59: 40R–47R.
15. 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): 1676–87.
16. Koebe HG, Dunn JC, Toner M, et al. A new approach to the cryopreservation of hepatocytes in a sandwich culture configuration. *Cryobiology*. 1990; 27(5): 576–84.
17. Kvist K, Thorup J, Byslov AG, et al. Cryopreservation of intact testicular tissue from boys with cryptorchidism. *Hum Reprod*. 2006; 21(2): 484–91.
18. Milazzo JP, Travers A, Bironneau A, et al. Rapid screening of cryopreservation protocols for murine prepubertal testicular tissue by histology and PCNA immunostaining. *J Androl*. 2010; 31(6): 617–30.
19. Miyamoto Y, Enosawa S, Takeuchi T, et al. Cryopreservation in situ of cell monolayers on collagen vitrigel membrane culture substrata: ready-to-use preparation of primary hepatocytes and ES cells. *Cell Transplant*. 2009; 18(5): 619–26.
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. Poels J, Abou-Ghannam G, Herman S, et al. In search of better spermatogonial preservation by supplementation of cryopreserved human immature testicular tissue xenografts with n-acetylcysteine and testosterone. *Front Surg* [Internet]. 2014; 1: 47. [Cited 01.02.2018] Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fsurg.2014.00047/full>.
22. Takahashi T, Hirsh A, Erbe E, Williams RJ. Mechanism of cryoprotection by extracellular polymeric solutes. *Biophys J*. 1988; 54(3): 509–18.
23. Volkova NA, Pavlovich EV, Gapon AA, Nikolov OT. Effects of millimeter-wave electromagnetic exposure on the morphology and function of human cryopreserved spermatozoa. *Bull Exp Biol Med*. 2014; 157(5): 574–6.
24. Volkova NO, Yukhta MS, Chernyshenko LG, et al. Exposure of seminiferous tubules of immature rats to cryoprotective media of various compositions. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2017; 27(3): 203–18.
25. Volkova NA, Yukhta MS, Goltsev A. Mesenchymal stem cells in restoration of fertility at experimental pelvic inflammatory disease. *Stem cells international* [Internet]. 2017; Article ID 2014132. [Cited 01.02.2018] Available from: <https://www.hindawi.com/journals/sci/2017/2014132/>.
8. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes. European Treaty Series No. 123 Strasbourg, 18.III.1986. Strasbourg: Council of Europe; 1986. 53p. [Cited 01.02.2018] Available from: <https://rm.coe.int/CoERMPublicCommonSearchServices/DisplayDCTMContent?documentId=090000168007a67b>.
9. 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; 27(1): 75–80. [Cited 01.02.2018] Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1472648313001296?via%3Dihub>.
10. Farrant J. Is there a common mechanism of protection of living cells by polyvinylpyrrolidone and glycerol during freezing? *Nature*. 1969; 222: 1175–6.
11. Ginsburg ES, Yanushpolsky EH, Jackson KV. In vitro fertilization for cancer patients and survivors. *Fertility and Sterility*. 2001; 75(4): 705–10.
12. Grill G, Porcellini A, Lucarelli G. Role of serum on cryopreservation and subsequent viability of mouse bone marrow hemopoetic stem cells. *Cryobiology*. 1980; 17(5): 516–20.
13. Jahnukainen K, Ehmcke J, Soder O, et al. Clinical potential and putative risks of fertility preservation in children utilizing gonadal tissue or germline stem cells. *Pediatr Res*. 2006; 59: 40R–47R.
14. Kaidasheva IP. [Methods of clinical and experimental research in medicine]. Poltava: Polimet; 2003. 320 p. Ukrainian.
15. 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): 1676–87.
16. Koebe HG, Dunn JC, Toner M, et al. A new approach to the cryopreservation of hepatocytes in a sandwich culture configuration. *Cryobiology*. 1990; 27(5): 576–84.
17. Kvist K, Thorup J, Byslov AG, et al. Cryopreservation of intact testicular tissue from boys with cryptorchidism. *Hum Reprod*. 2006; 21(2): 484–91.
18. Milazzo JP, Travers A, Bironneau A, et al. Rapid screening of cryopreservation protocols for murine prepubertal testicular tissue by histology and PCNA immunostaining. *J Androl*. 2010; 31(6): 617–30.
19. Miyamoto Y, Enosawa S, Takeuchi T, et al. Cryopreservation in situ of cell monolayers on collagen vitrigel membrane culture substrata: ready-to-use preparation of primary hepatocytes and ES cells. *Cell Transplant*. 2009; 18(5): 619–26.
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. Poels J, Abou-Ghannam G, Herman S, et al. In search of better spermatogonial preservation by supplementation of cryopreserved human immature testicular tissue xenografts with n-acetylcysteine and testosterone. *Front Surg* [Internet]. 2014; 1: 47. [Cited 01.02.2018] Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fsurg.2014.00047/full>.
22. Takahashi T, Hirsh A, Erbe E, Williams RJ. Mechanism of cryoprotection by extracellular polymeric solutes. *Biophys J*. 1988; 54(3): 509–18.
23. Volkova NA, Pavlovich EV, Gapon AA, Nikolov OT. Effects of millimeter-wave electromagnetic exposure on the morphology and function of human cryopreserved spermatozoa. *Bull Exp Biol Med*. 2014; 157(5): 574–6.
24. Volkova NO, Yukhta MS, Chernyshenko LG, et al. Exposure of seminiferous tubules of immature rats to cryoprotective media of various compositions. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2017; 27(3): 203–18.
25. Volkova NA, Yukhta MS, Goltsev A. Mesenchymal stem cells in restoration of fertility at experimental pelvic inflammatory disease. *Stem cells international* [Internet]. 2017; Article ID 2014132. [Cited 01.02.2018] Available from: <https://www.hindawi.com/journals/sci/2017/2014132/>.

26. Williams RJ. The surface activity of PVP and other polymers and their antihemolytic capacity. *Cryobiology*. 1983; 20: 521–6.
27. Wyns C, Curaba M, Vanabelle B, et al. Options for fertility preservation in prepubertal boys. *Hum Reprod Update*. 2010; 16(3): 312–28.
28. Yuditseva N, Pleskach N, Smagina L, et al. Reconstruction of connective tissue from fibrin-based dermal equivalent transplanted to animals with experimental wounds. *Cell and Tissue Biology*. 2010; 4(5): 476–80.
26. Williams RJ. The surface activity of PVP and other polymers and their antihemolytic capacity. *Cryobiology*. 1983; 20: 521–6.
27. Wyns C, Curaba M, Vanabelle B, et al. Options for fertility preservation in prepubertal boys. *Hum Reprod Update*. 2010; 16(3): 312–28.
28. Yuditseva N, Pleskach N, Smagina L, et al. Reconstruction of connective tissue from fibrin-based dermal equivalent transplanted to animals with experimental wounds. *Cell and Tissue Biology*. 2010; 4(5): 476–80.

