

## Исследование стероидогенного потенциала биологического материала тестисов половозрелых крыс после криоконсервирования

UDC 57.043:591.463.2.085

A.V. PAKHOMOV\*, G.A. BOZHOK, T.M. GURINA

## Study of Steroidogenic Potential of Post-Thaw Biological Material of Mature Rats' Testes

Проведено сравнительное исследование стероидогенных потенциалов биологического материала тестисов половозрелых крыс после криоконсервирования. Биологический материал тестисов в виде криоконсервированной суспензии клеток интерстиция (СКИ) обладает большей способностью к синтезу и секреции половых стероидов по сравнению с фрагментами тестисов. Использование разработанного нами способа криоконсервирования для СКИ приводит к лучшей сохранности стероидогенных клеток по сравнению с существующими аналогичными режимами.

**Ключевые слова:** тестостерон, клетки Лейдига, скорость охлаждения,  $3\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназа, переохлаждение.

Проведено порівняльне дослідження стероїдогенних потенціалів біологічного матеріалу тестисів статевозрілих щурів після криоконсервування. Біологічний матеріал тестисів у вигляді криоконсервованої суспензії клітин інтерстицію (СКИ) має більшу здатність до синтезу і секреції статевих стероїдів у порівнянні з фрагментами тестисів. Використання розробленого нами способу криоконсервування для СКИ дозволяє краще зберігати стероїдогенні клітини у порівнянні з існуючими аналогічними режимами.

**Ключові слова:** тестостерон, клітини Лейдига, швидкість охолодження,  $3\beta$ -гидроксистероїддегидрогеназа, переохолодження.

Comparative study of steroidogenic potentials of biological material of testes of mature rats after cryopreservation was performed. Biological materials of testes as cryopreserved suspension of interstitial cells has higher ability to synthesize and secrete sexual steroids if compared with testes fragments. Use of designed by us cryopreservation method for interstitial cell suspension (ICS) results in higher integrity of steroidogenic cells if compared with existing analogous regimens.

**Keywords:** testosterone, Leydig cells, cooling rate,  $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase, overcooling.

Трансплантация ткани и клеток мужских гонад – один из способов решения проблем андрогенной недостаточности, которая развивается как следствие различных патологических состояний организма или длительной гормональной терапии. Однако для эффективного использования данного метода необходимо создать банк полноценного донорского материала, обеспечивающего его долгосрочное хранение.

Криоконсервирование мужских гонад позволяет сохранить значительный стероидогенный потенциал биологического материала. В [1, 7–9] описаны программы для замораживания фрагментов фетальной тестикулярной ткани человека, фрагментов и клеток тестисов взрослых крыс. В качестве криопротектора использовали ДМСО. Образцы охлаждали со скоростью  $1-2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  до температур  $-40...-70^{\circ}\text{C}$  с последующим их погружением в жидкий азот. Медленное охлаждение в этих режимах позволяет сохранить морфологическую структуру тканей тестисов.

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

\* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Перейславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-30-07, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

Transplantation of tissue and cells of male gonads is one of the ways to solve the problem of androgenic insufficiency, developing as the result of different pathological states of an organism or lasting hormonal therapy. However for efficient use of this method it is necessary to establish bank of valuable donor's material, providing its long-term storage.

Cryopreservation of male gonads enables to preserve significant steroidogenic potential of biological material. The reports [1, 7–9] describe the freezing protocols for the fragments of fetal human testicular tissue, fragments and cells of adult rats' testes. DMSO was used as cryoprotectant. The samples were cooled with the rate of  $1-2^{\circ}\text{C}/\text{min}$  down to the temperatures of  $-40...-70^{\circ}\text{C}$  with following their plunging into liquid nitrogen. Slow cooling with these regimens allows the preservation of morphological structure of testes tissue.

However the same cooling rates used for testes cryopreservation as a cell suspension from our point of view do not provide the same good outcome on bio-

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

\* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3007, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Однако аналогичные скорости охлаждения, используемые для криоконсервирования тестисов в виде клеточной суспензии, по нашему мнению, не обеспечивают таких же высоких результатов по сохранности биоматериала, которые получены для фрагментов. При криоконсервировании клеточного материала необходимо учесть физические процессы, происходящие в охлаждаемой системе при различных скоростях охлаждения в разных температурных диапазонах для создания наиболее оптимального режима, позволяющего сохранить стероидогенные клетки.

На основе данных о сохранности стероидпродуцирующих клеток в зависимости от скорости их охлаждения в разных температурных интервалах нами была разработана программа замораживания биологического материала тестисов взрослых крыс в виде суспензии клеток интерстиция (СКИ) [1]. Программа замораживания включала начальную скорость охлаждения 1–2°C/мин, процедуру программного снятия переохлаждения, последующее использование более высоких скоростей (15–20°C/мин) при охлаждении до –40°C и в интервале температур от –40 до –70°C (20–25°C/мин) с дальнейшим погружением образцов в жидкий азот.

Цель работы – исследовать влияние различных режимов замораживания на сохранность стероидогенных свойств СКИ и фрагментов тестисов (ФТ).

В соответствии с поставленной целью предполагалось решить следующие задачи. Исследовать сохранность стероидогенных свойств (продукция тестостерона, 3β-гидроксистероиддегидрогеназная активность, наличие липидных включений) СКИ и ФТ, которые были криоконсервированы со скоростью 1–2°C/мин до –40 и –70°C с последующим погружением в жидкий азот. На основании этих данных сделать вывод о влиянии на сохранность материала медленного охлаждения и разной конечной температуры охлаждения образца перед погружением в жидкий азот. Дать сравнительную оценку стероидогенных свойств биологического материала тестисов в виде СКИ и ФТ.

### Материалы и методы

Эксперименты проведены в соответствии с “Общими принципами экспериментов на животных”, одобренными II Национальным конгрессом по биоэтике (20.09.04 г., Киев) и согласованными с положениями “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей” (Страсбург, 1985).

Материал тестисов получали от половозрелых животных в возрасте 4–5 месяцев. После экстирпации семенники освобождали от оболочки, измель-

material preservation, if compared with those obtained for the fragments. During cryopreservation of cells it is necessary to take into account physical processes occurring in the system under cooling at different cooling rates within various temperature ranges for the creation of the most optimal regimens enabling to preserve steroidogenic cells.

Based on the data about the integrity of steroid-producing cells depending on their cooling rates within various temperature intervals we have designed the freezing protocol for testes biological material of mature rats as interstitial cell suspension (ICS) [1]. Freezing program comprised initial cooling rate of 1–2°C, the procedure of programmable overcooling dismissal, following use of higher rates (15–20°C) during cooling down to –40°C and within the temperature interval from –40 down to –70°C (20–25°C/min) with following immersion of samples in liquid nitrogen.

The research aim is to study the effect of different freezing regimens on integrity of steroidogenic properties of ICS and testes fragments (TFs).

In accordance with the set goal there was proposed to solve the following tasks: to study the integrity of steroidogenic properties (production of testosterone, 3β-hydroxysteroiddehydrogenase activity, presence of lipid inclusions) of ICS and TFs, cryopreserved with the rate of 1–2°C/min down to –40 and –70°C with following plunging into liquid nitrogen; based on these data to conclude on the effect of slow cooling and different final temperature of sample cooling on material integrity prior to submerging into liquid nitrogen; to comparatively estimate the steroidogenic properties of biological material of testes as ICS and FTs.

### Materials and methods

The experiments were performed in accordance with “General principles of experiments in animals”, approved by the 2<sup>nd</sup> National Congress on bioethics (20.09.04, Kiev) and coordinated with the statements of European convention for the “Protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes” (Strasbourg, 1985).

The material of testes was obtained from mature animals aged from 4 to 5 months. After extirpation the coating was removed from testes, afterwards they were disintegrated into fragments by 0.5–1 mm<sup>3</sup>, washed-out from blood with medium 199 and used as the TFs.

For ICS obtaining the testes after extirpation were subjected to mild treatment with collagenase (4 mg/ml) in medium 199 with 20 mM Hepes (pH 7.4) at 32–34°C and constant mixing for 15 min. Prior to separation of the resulted suspension of cells in sucrose gradient density the primary sedimentation of tubular structures was performed, afterwards the fraction of cells with the density of 1.127–1.176 g/cm<sup>3</sup> was

чали на фрагменты 0,5–1 мм<sup>3</sup>, промывали от крови средой 199 и использовали как ФТ.

Для получения СКИ тестисы после экстирпации подвергали мягкой обработке коллагеназой (4 мг/мл) на среде 199 с 20 мМ HEPES (pH 7,4) при 32–34°C и непрерывном встряхивании на протяжении 15 мин. Перед разделением полученной суспензии клеток в градиенте плотности сахарозы осуществляли первичное осаждение тубулярных структур, после чего была получена фракция клеток плотностью 1,127–1,176 г/см<sup>3</sup>. Клетки отмывали средой 199 с 20 мМ HEPES (pH 7,4) для дальнейшего использования в экспериментах.

Показатели ФТ и СКИ на данном этапе исследований принимали за контрольные (интактный контроль).

При криоконсервировании ФТ и СКИ использовали раствор криопротектора ДМСО, который готовили на среде 199 с 20 мМ HEPES и в соотношении 1:1 добавляли к клеткам для достижения конечной концентрации 10%. Объем замораживаемого образца составлял 1 мл.

После добавления раствора криопротектора образцы охлаждали на программном замораживателе “Cryoson” (Германия) в криоампулах (“Nunc”, США). Регистрацию программы замораживания проводили при помощи установленной в криоампулы медь-константановой термопары и самописца типа “Endim” 622.01.

При криоконсервировании образцов использовали следующие программы:

– программа 1 (для ФТ и СКИ): от 22–24 до –40°C образцы охлаждали со скоростью 1–2°C/мин. После достижения температуры –40°C образцы погружали в жидкий азот;

– программа 2 (для СКИ): от 22–24 до –70°C образцы охлаждали со скоростью 1–2°C/мин. После достижения температуры –70°C образцы погружали в жидкий азот;

– программа 3 (для СКИ): образцы охлаждали от 22–24°C со скоростью 1–2°C/мин. После программного снятия переохлаждения, предусмотренного возможностями замораживателя “Cryoson”, скорость охлаждения до –40°C была 15–20°C/мин, а в интервале температур от –40 до –70°C – 20–25°C/мин.

Отогревали образцы на водяной бане при температуре 32–34°C. ДМСО удаляли при постепенном снижении его концентрации в среде.

Гистохимическое окрашивание на выявление активности 3β-гидроксистероиддегидрогеназы (3β-ГСД) проводили методом, описанным в [6]. Для этого 2–4×10<sup>6</sup> клеток инкубировались в 2,5 мл забуференного физиологического раствора (pH 7,4), содержащего 0,2 мг/мл нитросинего тетразолия,

obtained. The cells were washed out with medium 199 with 20 mM HEPES (pH 7.4) for further use in experiments.

Characteristics of TFs and ICS on this stage of investigations were considered as control values (intact control).

During cryopreservation of TFs and ICS there was used the solution of DMSO cryoprotectant, prepared with medium 199 with 20 mM HEPES and in 1:1 ratio was added to cells for achieving the final concentration of 10%. The volume of the samples under freezing was 1 ml.

After adding the cryoprotective solution the samples were cooled with programmable freezer “Cryoson” (Germany) in cryovials (“Nunc”, USA). The recording of freezing program was performed using the copper-constantan thermocouple adjusted in cryovials and with recording device of the “Endim” 622.01 type.

During cryopreservation of the samples the following protocols were used:

– program 1 (for TFs and ICS): from 22–24 down to –40°C the samples were cooled with the rate of 1–2°C/min. When achieving –40°C the samples were plunged into liquid nitrogen;

– program 2 (for ICS): from 22–24 down to –70°C the samples were cooled with the rate of 1–2°C/min. When achieving –70°C the samples were plunged into liquid nitrogen;

– program 3 (for ICS): the samples were cooled from 22–24°C with the rate of 1–2°C/min. After programmable dismissal of overcooling foreseen with the capacities of “Cryoson” freezer, the cooling rate down to –40°C was 15–20°C/min and 20–25°C/min within temperature interval from –40 down to –70°C.

The samples were thawed on water bath at 32–34°C. DMSO was removed by stepwise reduction of its concentration in the medium.

Histochemical staining on revealing the activity of 3β-hydroxysteroiddehydrogenase (3β-HSD) was performed with the method described [6]. For this aim 2–4×10<sup>6</sup> cells were incubated in 2.5 ml buffered physiological solution (pH 7.4), containing 0.2 mg/ml nitroblue tetrasolium, 1 mg/ml NAD and 0.12 mg/ml dehydroepiandrosterone for 90 min at 32–34°C. Positively stained cells (HSD(+)-cells) had violet staining on recovered tetrasolium.

Staining with Nile red (NR) was performed on the method reported [10]. The dye (1 g) was diluted in 1 ml DMSO. Prior to staining the solution of dye was diluted by 1:100 with physiological solution with phosphate buffer (pH 7.4) and 15 ml of this solution was added to 1 ml of physiological solution with phosphate buffer. The recording of fluorescence was done at excitation wavelength 455–500 nm with fluorescent microscope “Olympus IX 71”.

1 мг/мл НАД и 0,12 мг/мл дегидроэпиандростерона в течение 90 мин при 32–34°C. Позитивно окрашенные клетки (ГСД(+)-клетки) имели фиолетовую окраску восстановленного тетразолия.

Окрашивание нильским красным (НК) проводили по методу, описанному в [10]. В 1 мл ДМСО растворяли 1 мг красителя. Перед окрашиванием раствор красителя разводили 1:100 физиологическим раствором на фосфатном буфере (рН 7,4) и добавляли 15 мкл данного раствора к 1 мл клеточной суспензии ( $1-2 \times 10^6$  кл/мл). Окрашивали 10 мин при 32–34°C. После окрашивания клетки однократно отмывали от избытка красителя 1 мл физиологического раствора на фосфатном буфере. Регистрацию флюоресценции проводили при длине волны возбуждения 455–500 нм при помощи флюоресцентного микроскопа “Olympus IX 71”.

Для определения общей сохранности клеток, сохранности ГСД(+)-клеток и клеток, включающих НК (НК(+)-клетки) во ФТ, их дополнительно обрабатывали коллагеназой и разделяли полученную суспензию клеток в градиенте плотности сахарозы аналогично методу получения СКИ.

Сохранность клеток контролировали методом суправитального окрашивания трипановым синим. Общую сохранность клеток после замораживания по различным программам, а также сохранность ГСД(+)- и НК(+)-клеток выражали в процентах по отношению к количеству этих клеток в образцах до замораживания.

Базальную и стимулированную секрецию тестостерона исследовали путем инкубации СКИ и ФТ в среде 199 с 20 мМ HEPES в течение часа при 32–34°C. Как стимулятор стероидогенеза использовали хорионический гонадотропин (ХГ) в концентрации 1 МЕ/мл. Содержание тестостерона измеряли в инкубационной среде радиоиммунологическим методом при помощи наборов “РИА СТ-тестостерон” и рассчитывали на количество клеток в образцах до замораживания.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа и t-критерия Стьюдента с помощью пакета программ Excel.

### Результаты и обсуждение

Фрагменты тестисов состоят из двух основных компонентов: семенных канальцев и расположенного между ними комплекса интерстициальных клеток, включающих клетки Лейдига, ответственные за синтез мужских половых стероидных гормонов.

3 $\beta$ -ГСД представляет собой один из ключевых ферментов в реакциях превращения эфиров холестерина, находящихся в клетке в виде липидных капель, в тестостерон. Таким образом, 3 $\beta$ -ГСД и нали-

For determining the total integrity of cells, integrity of HSD(+)-cells and those including NR (NR(+)-cells) into TFs, they were additionally treated with collagenase and the resulted suspension of cells was centrifuged in sucrose density gradient similar to the method of ICS obtaining.

Cell integrity was controlled with the method of supravital staining with trypane blue. Total integrity of cells after freezing on various programs in respect to the number of these cells in the samples prior to freezing was expressed in percentage.

Basal and stimulated secretions of testosterone were studied by means of incubation of ICS and TFs in the medium 199 with 20 mM HEPES for an hour at 32–34°C. Chorionic gonadotropin (CG) under 1 IU/ml concentration was used as steroidogenesis stimulator. Testosterone content was measured in incubation medium with radio immunological method using the kits “RIA ST-testosterone” (Russia) and counted per the number of cells in samples prior to freezing.

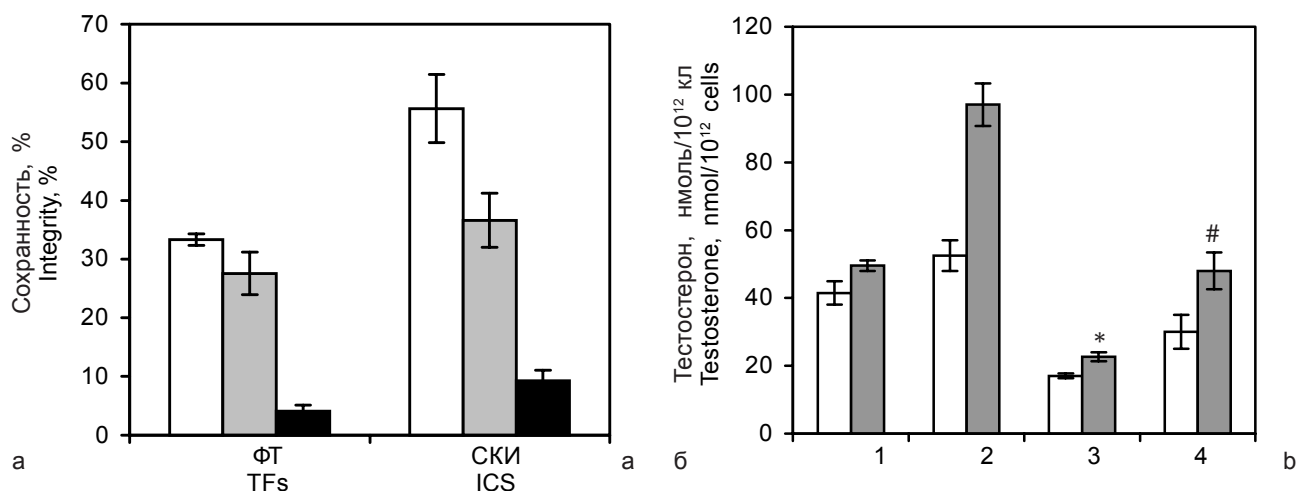
Statistical processing of the results was performed using single factor dispersion analysis and Student’s t-criterion with Excel software.

### Results and discussion

Testes fragments consist of two main components: seminiferous tubules and located between them complex of interstitial cells, including Leydig cells responsible for the synthesis of male sexual steroid hormones. 3 $\beta$ -HSD represents one of key enzymes in the reactions of transformation of the cholesterol ethers, being in a cell as lipid drops, into testosterone. Thus 3 $\beta$ -HSD and presence of significant amount of lipid inclusions are the characteristics of steroid-production of cells in testes. To reveal the activity of 3 $\beta$ -HSD the histochemical reaction with nitroblue tetrasolium [6] is used and for the visualization of lipid inclusions the NR staining is used [10].

Fig. 1, a shows that total integrity of cells, the one of HSD(+)- and NR(+)-cells sharply decreased after cryopreservation of ICS and TFs using program 1. In these samples the number of HSD(+)-cells reduced almost down to 30% and the integrity of NR(+)-cells did not exceed 10%.

The ability to basal and stimulated steroidogenesis of ICS and TFs, cryopreserved with program 1, was also reduced if compared with non-frozen samples (Fig. 1, b). testosterone content in incubation medium of TFs after CG secretion stimulation made about  $23 \pm 0.33$  nmol/ $10^{12}$  cells, that was more than twice lower than prior to freezing ( $49 \pm 1.0$  nmol/ $10^{12}$  cells) and  $48 \pm 5$  nmol/ $10^{12}$  cells in incubation medium of ICS, that was also twice lower the level found prior to freezing ( $976$  nmol/ $10^{12}$  cells). This testified to a significant cryo-damage of steroidogenic cells, developing during cryopreservation with program 1.



**Рис. 1.** Сохранность клеток ФТ и СКИ после криоконсервирования с использованием программы 1 (а): □ – общая сохранность; ■ – сохранность ГСД(+)-клеток; ■ – сохранность НК(+)-клеток. Способность к базальному и стимулированному стероидогенезу (б): □ – базальная секреция; ■ – стимулированная секреция. 1 – нативных ФТ; 2 – нативной СКИ; 3 – криоконсервированных ФТ; 4 – криоконсервированной СКИ; \* – различия достоверны относительно нативных ФТ ( $p < 0,05$ ); # – различия достоверны относительно нативной СКИ ( $p < 0,05$ ).

**Fig. 1.** Integrity of TFs and ICS cells after cryopreservation using program 1 (a): □ – total integrity; ■ – integrity of HSD(+)-cells; ■ – integrity of NR(+)-cells. Ability to basal and stimulated steroidogenesis (b): □ – basal secretion; ■ – stimulated secretion. 1 – native TF; 2 – native ICS; 3 – cryopreserved TFs; 4 – cryopreserved ICS; \* – differences are statistically significant versus native TFs ( $p < 0.05$ ); # – differences are statistically significant versus native ICS ( $p < 0.05$ ).

чие значительного количества липидных включений являются характеристикой стероидпродуцирующих клеток в тестисах. Для выявления активности  $3\beta$ -ГСД используют гистохимическую реакцию с нитросиним тетразолием [6], а для визуализации липидных включений – краситель НК [10].

Как видно из рис. 1, общая сохранность клеток, сохранность ГСД(+)- и НК(+)-клеток резко снижались после криоконсервирования СКИ и ФТ с использованием программы 1. В этих образцах уменьшалось количество ГСД(+)-клеток практически до 30%, а сохранность НК(+)-клеток не превышала 10%.

Способность к базальному и стимулированному стероидогенезу СКИ и ФТ, криоконсервированных по программе 1, также снижалась по сравнению с незамороженными образцами (рис. 1, б). Содержание тестостерона в среде инкубации ФТ после стимуляции секреции ХГ составляло около  $23 \pm 0,3$  нмоль/ $10^{12}$  клеток, что более чем в 2 раза ниже до замораживания ( $49 \pm 1,0$  нмоль/ $10^{12}$  клеток), а в среде инкубации СКИ –  $48 \pm 5,0$  нмоль/ $10^{12}$  клеток, что было также в 2 раза ниже уровня, установленного до замораживания ( $97 \pm 6,0$  нмоль/ $10^{12}$  клеток). Это свидетельствовало о значительном криоповреждении стероидогенных клеток, которые развиваются при криоконсервировании по программе 1.

Использование относительно медленных режимов охлаждения ( $1-2^\circ\text{C}/\text{мин}$ ) до  $-40^\circ\text{C}$  для фрагментов тестисов было отмечено в [2, 5]. Это оправдано в связи с возможностью негативного влияния температурных градиентов и напряжений, вызван-

Use of relatively slow cooling regimens ( $1-2^\circ\text{C}/\text{min}$ ) down to  $-40^\circ\text{C}$  for testes fragments was reported elsewhere [2, 5]. This is feasible due to possible negative effect of temperature gradients and tensions caused with irregular ice propagation in a sample during freezing that impairs the structure of fragment tissue and reduces the cell integrity in them.

In [7, 9] there was shown the use of slow cooling at cryopreservation of Leydig cells, herewith their viability made 75%. The samples were cooled with constant rate of  $1^\circ\text{C}/\text{min}$  down to  $-70^\circ\text{C}$ , afterwards they were plunged into liquid nitrogen. In our experiments the application of program 2 for ICS did not result in the increase of total cell integrity, the one of HSD(+)- and NR(+)-cells if compared to the program 1 (Fig. 2, a). Basal and stimulated steroidogenesis as well statistically and significantly did not differ from the indices of testosterone level, found at program 1 realization (Fig. 2, b).

Use of programs 1 and 2 during ICS cryopreservation did not result in satisfactory integrity and functional activity of steroidogenic Leydig cells in ICS.

When investigating the effect of overcooling and cooling rate within different temperature intervals on  $3\beta$ -HSD activity and integrity of cells having lipid inclusions as well as their hormone production we have proposed the cooling protocols on program 3 [1], comprising programmable dismissal of overcooling, foreseen with the capacities of “Cryoson” freezer and higher if compared with programs 1 and 2 cooling rates down to  $-70^\circ\text{C}$ .

The result of using program 3 (Fig. 3, a) was an increased integrity of cells with  $3\beta$ -HSD activity by

ных неравномерным расширением льда в образце в процессе замораживания, что нарушает структуру тканей фрагмента и снижает сохранность клеток в них.

В [7, 9] было показано использование медленного охлаждения и при криоконсервировании клеток Лейдига, при этом их жизнеспособность составляла 75%. Образцы охлаждали с постоянной скоростью 1°C/мин до температуры  $-70^{\circ}\text{C}$ , затем погружали в жидкий азот. В наших экспериментах использование программы 2 для СКИ не приводило к увеличению общей сохранности клеток, сохранности ГСД(+)- и НК(+)-клеток по сравнению с программой 1 (рис. 2, а). Базальный и стимулированный стероидогенез также достоверно не отличался от показателей уровня тестостерона, установленных при реализации программы 1 (рис. 2, б).

Использование при криоконсервировании СКИ программ 1 и 2 не приводит к удовлетворительной сохранности и функциональной активности стероидогенных клеток Лейдига в СКИ.

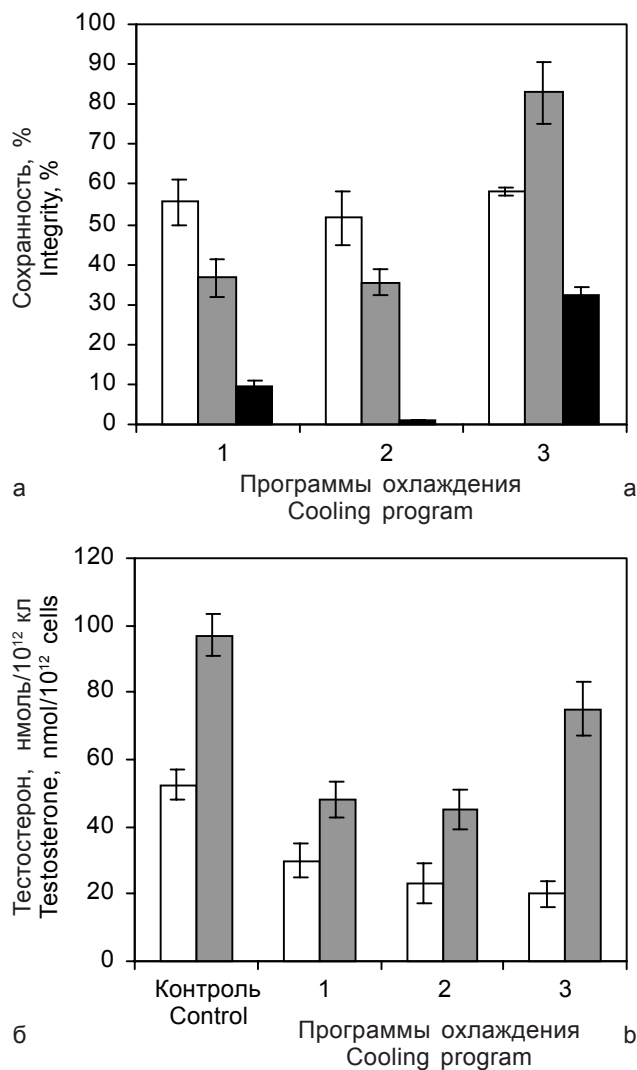
При исследовании влияния переохлаждения и скорости охлаждения в различных температурных интервалах на  $3\beta$ -ГСД активность и сохранность клеток, имеющих липидные включения, а также их гормонопродукцию нами был предложен режим охлаждения по программе 3 [1], включающий программное снятие переохлаждения, предусмотренное возможностями замораживателя "Styocon", и более высокие по сравнению с программами 1 и 2 скорости охлаждения до температуры  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Результатом использования программы 3 (рис. 2, а) было увеличение сохранности клеток, обладающих  $3\beta$ -ГСД активностью, на 50% (с 33 до 83%) и клеток, имеющих липидные включения (до 32%), по сравнению с программами 1 и 2. Также значительно была сохранена способность к базальному и стимулированному стероидогенезу (рис. 2, б). Содержание тестостерона в среде инкубации СКИ, криоконсервированной по программе 3, при стимуляции ХГ составляло  $75 \pm 6$  нмоль/ $10^{12}$  клеток (77% от нативного контроля).

Таким образом, использование криоконсервированного клеточного материала тестисов в виде СКИ, криоконсервированной по программе 3, как источника стероидогенных гормонов более предпочтительно, чем фрагментов ткани.

Сравнивая стероидогенные свойства биологического материала тестисов в виде криоконсервированной по программе 3 СКИ с результатами использования аналогичных режимов охлаждения [7, 9], нами была показана лучшая сохранность клеток, ответственных за синтез тестостерона.

В результате снятия переохлаждения и повышения скорости охлаждения удалось получить



**Рис. 2.** Сохранность клеток СКИ (а): □ – общая сохранность; ■ – сохранность ГСД (+)-клеток; ■ – сохранность НК (+)-клеток. Базальная и стимулированная секреция тестостерона СКИ (б) после криоконсервирования с использованием различных программ охлаждения: □ – базальная секреция; ■ – стимулированная секреция; \* – различия достоверны относительно данных для программы 1 ( $p < 0,05$ ).

**Fig. 2.** Integrity of ICS cells (a): □ – total integrity; ■ – integrity of HSD(+)-cells; ■ – integrity of NR(+)-cells. Ability to basal and stimulated secretion of testosterone by ICS (b) after cryopreservation using different cooling protocols. □ – basal secretion; ■ – stimulated secretion; \* – differences are statistically significant comparing to the data for program 1 ( $p < 0.05$ ).

50% (from 33 to 83%) and the cells having lipid inclusions (up to 32%) if compared with programs 1 and 2. As well there was significantly preserved the ability to basal and stimulated steroidogenesis (Fig 2, b). Content of testosterone in incubation medium of ICS cryopreserved on program 3 with the CG stimulation made  $75 \pm 6$  nmol/ $10^{12}$  cells (77% versus native control).

Thus, use of cryopreserved cell material of testes as ICS (program 3) as the source of steroidogenic hor-

криоконсервированный материал СКИ с 83% сохранностью клеток, обладающих активностью  $3\beta$ -ГСД, которая является одним из маркеров клеток Лейдига. Этот показатель значительно превышает результат, полученный при использовании скорости охлаждения  $1-2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  (75%) [9].

Нами была получена 77%-я сохранность способности клеток к стимулированной секреции тестостерона в ответ на тропную стимуляцию, что не уступает аналогичным показателям, приведенным в [7, 9].

Использование в программе 3 более низких концентраций ДМСО (10%) по сравнению с 15% ДМСО в [7, 9] является преимуществом, так как ДМСО в более высоких концентрациях может проявлять токсические эффекты [3, 4].

### Выводы

Использование скорости охлаждения  $1-2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ , неконтролируемой скорости охлаждения в температурном диапазоне от  $-40$  до  $-70^{\circ}\text{C}$  при криоконсервировании биологического материала тестисов в виде СКИ и ФТ приводит к гибели значительного количества стероидогенных клеток и снижению способности материала к продукции тестостерона.

Программное снятие переохлаждения и увеличение скорости охлаждения до  $15-20^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  при охлаждении до  $-40^{\circ}\text{C}$ , а в диапазоне температур  $-40...-70^{\circ}\text{C}$  до  $20-25^{\circ}\text{C}/\text{мин}$  (программа 3) приводит к увеличению сохранности криоконсервированных стероидогенных клеток на 50% и их способности к базальному и стимулированному синтезу и секреции тестостерона на 26%.

Биологический материал тестисов в виде СКИ, криоконсервированный с использованием программы 3, обладает большей способностью к синтезу и секреции половых стероидов по сравнению с нативными и криоконсервированными ФТ ( $75 \pm 6,0$  против  $49 \pm 0,5$  и  $23 \pm 0,3$  нмоль/ $10^{12}$  клеток).

### Литература

1. Гурина Т.М., Пахомов А.В., Божок Г.А. Влияние скорости охлаждения в различных температурных интервалах на сохранность стероидогенного потенциала суспензии интерстициальных клеток семенников взрослых крыс // Пробл. криобиологии.– 2007.– Т. 17, №4.– С. 394–402.
2. Керос В.А. Криоконсервация фетотестикулярной ткани человека: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.– Харьков, 2001.– 19 с.
3. Пахомов А.В., Божок Г.А., Бондаренко Т.П. Влияние диметилсульфоксида на базальную и стимулированную секрецию тестостерона клетками интерстиция семенника новорожденных поросят: Материалы IX з'їзду укр. біохім. товариства // Укр. біохім. журнал.– 2006.– Т. 2.– С. 18.
4. Пушкарь Н.С. Криопротекторы.– Киев: Наук. думка.– 1978.– 201 с.

mones was more preferable if compared to the tissue fragments.

When comparing the steroidogenic properties of biological material of testes as the cryopreserved on program 3 ICS with the results we have shown higher cell integrity responsible for testosterone synthesis.

As a result of dismissal of overcooling and increase of cooling rate it was managed to obtain cryopreserved material of ICS with 83% integrity of cells having  $3\beta$ -HSD activity, which is one of the markers of Leydig cells. This index significantly exceeds the result reported [9] when using cooling rate of  $1-2^{\circ}\text{C}/\text{min}$  (75%).

We have obtained 77% integrity of cell capability to testosterone stimulated secretion in response to tropic stimulation, and this fact is in coordination with the same parameters reported [7, 9].

Use of lower DMSO concentrations (10%) if compared with 15% DMSO in program 3 is the advantage, since DMSO under higher concentrations may manifest toxic effects [3, 4].

### Conclusions

Use of cooling rate of  $1-2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , non-controlled cooling rate within temperature range from  $-40$  down to  $-70^{\circ}\text{C}$  during cryopreservation of biological material of testes as ICS and TFs results in the death of significant number of steroidogenic cells and reduced ability of the material to produce testosterone.

Programmable removal of overcooling and rise in cooling rate up to  $15-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$  during cooking down to  $-40^{\circ}\text{C}$  and within the temperature range from  $-40...-70^{\circ}\text{C}$  up to  $20-25^{\circ}\text{C}/\text{min}$  (program 3) leads to the increase of the survival of cryopreserved steroidogenic cells by 50% and their ability to basal and stimulated synthesis and secretion of testosterone by 26%.

Biological materials of testes as ICS cryopreserved using the program 3 possesses higher ability to synthesize and secrete sexual steroids if compared with native and cryopreserved TFs ( $75.0 \pm 5.0$  vs.  $49 \pm 0.5$  and  $23 \pm 0.33$  nmol/ $10^{12}$  cells).

### References

1. Gurina T.M., Pakhomov A.V., Bozhok G.A. Effect of cooling rate under various temperature intervals on survival of steroidogenic potential of suspension of interstitial cells of adult rat's testes// Problems of Cryobiology.– 2007.– Vol.17, N4.– P. 394–402.
2. Keros V.A. Cryopreservation of human fetotesticular tissue: Author's abstract of the thesis of Candidate of Medical Sciences.– Kharkiv, 2001.– 19 p.
3. Pakhomov A.V., Bozhok G.A., Bondarenko T.P. Effect of dimethyl sulfoxide on basal and stimulated secretion of testosterone with interstitial cells of newborn piglets // Ukr. Biokhem. Zhurn.– 2006.– Vol. 2.– P. 18.

5. *Салех Дж. М. Абу Жаяб.* Коррекция андрогенной функции у экспериментальных животных путем трансплантации нативных и криоконсервированных органных культур семенников: Дис. ...канд. мед. наук. – Киев, 2004. – 129 с.
  6. *Benton L., Shan L.X., Hardy M.P.* Differentiation of adult Leydig cells // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* – 1995. – Vol. 53, N1–6. – P. 61–68.
  7. *Chen G.R., Ge R.S., Lin H. et al.* Development of a cryopreservation protocol for Leydig cells // *Hum. Reprod.* – 2007. – Vol. 22, N8. – P. 2160–2168.
  8. *Keros V., Rosenlund B., Hultenby K. et al.* Optimizing cryopreservation of human testicular tissue: comparison of protocols with glycerol, propanediol and dimethylsulphoxide as cryoprotectants // *Hum. Reprod.* – 2005. – Vol. 20, N6. – P. 1676–1687.
  9. *Tai J., Tze W.J., Johnson H.W.* Cryopreservation of rat Leydig cells for *in vitro* and *in vivo* studies // *Horm. Metab. Res.* – 1994. – Vol. 26, N3. – P. 145–147.
  10. *Tchoukalova Y.D., Harteneck D.A., Karwoski R.A. et al.* A quick, reliable, and automated method for fat cell sizing // *J. Lipid Res.* – 2003. – Vol. 44, N9. – P. 1795–1801.
4. *Pushkar N.S.* Cryoprotectants. – Kiev: Naukova Dumka. – 1978. – 201 p.
  5. *Salekh J. M. Abu Jajab.* Correction of androgen function in experimental animals by transplantation of native and cryopreserved organ cultures of testes: Author's abstract of the thesis of Candidate of Medical Sciences. – Kiev, 2004. – 129 p.
  6. *Benton L., Shan L.X., Hardy M.P.* Differentiation of adult Leydig cells // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* – 1995. – Vol. 53, N1–6. – P. 61–68.
  7. *Chen G.R., Ge R.S., Lin H. et al.* Development of a cryopreservation protocol for Leydig cells // *Hum. Reprod.* – 2007. – Vol. 22, N8. – P. 2160–2168.
  8. *Keros V., Rosenlund B., Hultenby K. et al.* Optimizing cryopreservation of human testicular tissue: comparison of protocols with glycerol, propanediol and dimethylsulphoxide as cryoprotectants // *Hum. Reprod.* – 2005. – Vol. 20, N6. – P. 1676–1687.
  9. *Tai J., Tze W.J., Johnson H.W.* Cryopreservation of rat Leydig cells for *in vitro* and *in vivo* studies // *Horm. Metab. Res.* – 1994. – Vol. 26, N3. – P. 145–147.
  10. *Tchoukalova Y.D., Harteneck D.A., Karwoski R.A. et al.* A quick, reliable, and automated method for fat cell sizing // *J. Lipid Res.* – 2003. – Vol. 44, N9. – P. 1795–1801.

*Поступила 02.09.2008*  
*Рецензент В.Е. Чадаев*

*Accepted in 02.09.2008*