

## Кріоконсервування звитих каналців сім'яників статевонезрілих щурів із застосуванням низьких швидкостей охолодження

М.С. Юхта, Н.О. Волкова, А.М. Гольцев

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

## Cryopreservation of Seminiferous Tubules of Immature Rat Testes With Using of Low Cooling Rates

M.S. Yukhta, N.O. Volkova, A.M. Goltsev

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

На сьогодні кріоконсервування незрілих тканин яєчок є перспективним підходом до збереження фертильності у пацієнтів препубертатного віку з онкологічними захворюваннями, оскільки кріоконсервована незріла тестикулярна тканина може бути використана для ініціації сперматогенезу *in vitro* або трансплантації *in vivo*.

Мета роботи – оцінити морфологічно-функціональні характеристики звитих каналців сім'яників статевонезрілих щурів після заморожування-відігріву з використанням повільних швидкостей охолодження.

Фрагменти звитих каналців масою ( $75 \pm 5$ ) мг інкубували в кріозахисних середовищах на основі бичачого сироваткового альбуміну (БСА) (50 г/л у розчині Хенкса) або фібринового гелю (ФГ) із додаванням 0,6 М ДМСО протягом 30 хв при температурі 4°C. Кріоконсервування здійснювали з використанням заморожувача ЗП-10 за програмою: охолодження зі швидкістю 1 град/хв до -8°C; зупинка 10 хв при -8°C; охолодження зі швидкістю 10 град/хв до -70°C; перенесення у рідкий азот. Зразки відігрівали на водяній бані при 40°C до появи рідкої фази. Контролі: негативний (розчин Хенксу) та інтактна тканина. Морфологічно-функціональний стан клітин звитих каналців оцінювали за допомогою гістоморфометричних та біохімічних методів (МТТ-тест, загальна активність лактатдегідрогенази).

Було показано, що при кріоконсервуванні звитих каналців сім'яників статевонезрілих щурів із використанням ФГ ступінь ретракції і десквамації клітин сперматогенного епітелію знижувалась у порівнянні з БСА. Слід зазначити, що ФГ надавав виражену протективну дію, перешкоджаючи розвитку некрозу клітин сперматогенного епітелію, що виражалось в зниженні кількості ядер із конденсованим хроматином (<40%). Життєздатність клітин за методом суправітального забарвлення трипановим синім збільшувалась відносно негативного контролю в 2,6 рази у групі з застосуванням БСА та в 3,2 рази у групі з застосуванням ФГ. За результатами МТТ-тесту метаболічна активність клітин звитих каналців сім'яників після кріоконсервування під захистом 0,6 М ДМСО збільшувалась відносно негативного контролю в 1,8 рази у випадку використання БСА та в 3,2 рази – ФГ. Загальна активність ЛДГ також максимально була збережена в зразках, кріоконсервованих із використанням ФГ (в 2,6 рази вище ніж у негативному контролі). Відносно інтактного контролю життєздатність та метаболічна активність клітин в усіх досліджених зразках була вірогідно нижча.

Таким чином, програмне заморожування з контрольованою низькою швидкістю охолодження є найбільш результативним при застосуванні 0,6М ДМСО у комбінації з фібриновим гелем.

Today, cryopreservation of immature testicular tissues is a promising approach for preserving the fertility in prepubertal patients with malignancies, since cryopreserved immature testicular tissue can be used to initiate spermatogenesis *in vitro* or for transplantation *in vivo*.

The aim of the study was to evaluate the morphological and functional characteristics of the seminiferous tubules of immature rat testes after freeze-thawing using slow cooling rates.

Fragments of seminiferous tubules weighing ( $75 \pm 5$ ) mg were incubated in cryoprotective media based either on bovine serum albumin (BSA) solution (50 g/L in Hanks's solution) or fibrin gel (FG) supplemented with 0.6 M DMSO for 30 min at 4°C. Cryopreservation was carried out using a freezer ZP-10 (Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine) according to the program: cooling with 1 deg/min rate down to -8°C; pause at 8°C for 10 min; cooling with 10 deg/min rate down to -70°C; transfer into liquid nitrogen. The samples were thawed in a water bath at 40°C up to a liquid phase appearance. The controls were as follows: negative (Hanks's solution) and intact tissue. The morphological and functional state of the cells of seminiferous tubules was evaluated using histomorphometric and biochemical methods (MTT-test, general activity of LDH).

It was shown that after cryopreservation of the seminiferous tubules of immature rat testes using FG, the degree of retraction and desquamation of the spermatogenic epithelium was lower in comparison with BSA. It should be noted that the FG had a pronounced protective effect, preventing the development of necrosis in cells of spermatogenic epithelium, that was expressed in the reduced number of nuclei with condensed chromatin (<40%). The viability of cells assessed by supravital Trypan blue staining increased vs. the negative control by 2.6 times in the group with BSA and by 3.2 times in the group with FG. According to the results of the MTT-test, the metabolic activity of the cells of testes seminiferous tubules after cryopreservation under the protection of 0.6M DMSO increased compared to the negative control in 1.8 times in the case of BSA and by 3.2 times in the samples with FG. The total activity of LDH was also maximally preserved in the samples cryopreserved using FG (by 2.6 times higher than the negative control). If compared to an intact control the cell viability and metabolic activity were significantly lower in all the investigated samples.

Thus, the controlled rate freezing with the low cooling rate was the most effective if applying 0.6 M DMSO solution in combination with fibrin gel.

