

УДК 611.631-018.1-085.1-089.843:57.086.13

Б. Денг¹, В.А. Киреев², К.В. Мелентьева³, И.Ф. Коваленко², А.В. Пахомов^{1*}

Гистологическое исследование криоконсервированных неонатальных семенников крыс после интратестикулярной аллотрансплантации

UDC 611.631-018.1-085.1-089.843:57.086.13

B. Deng¹, V.O. Kireev², K.V. Melentyeva³, I.F. Kovalenko², O.V. Pakhomov^{2*}

Histology of Cryopreserved Neonatal Rat Testes After Intratesticular Allotransplantation

Реферат: Криоконсервирование и трансплантация фрагментов и клеток тестикул используются при создании банков гермоплазмы исчезающих видов, пород и линий животных. Помимо этого трансплантацию применяют при исследовании врожденных и приобретенных дефектов тестикулярной ткани. В связи с этим необходимо усовершенствование способов криоконсервирования и трансплантации. В данной работе проведено сравнение результатов гистологических исследований аллотрансплантации нативных и криоконсервированных неонатальных семенников. Показано, что использование контролируемых скоростей охлаждения при криоконсервировании и защитного раствора на основе 5 мг/мл бычьего сывороточного альбумина; 0,05 М сахарозы; 20 мМ HEPES, 1,5 М диметилсульфоксида в качестве криопротектора в среде DMEM/F12 с последующей интратестикулярной аллотрансплантацией неонатального семенника крысы способствовало развитию интерстиция и герминативного эпителия донорского органа в организме реципиента.

Ключевые слова: семенник, интратестикулярная аллотрансплантация, криоконсервирование, иммуносупрессия, иммунная привилегированность.

Реферат: Криоконсервировання та трансплантація фрагментів і клітин тестікул використовуються при створенні банків гермоплазми зникаючих видів, порід та ліній тварин. Крім того трансплантацію застосовують у дослідженнях вроджених і набутих дефектів тестикулярної тканини. У зв'язку з цим необхідним є удосконалення способів криоконсервувannya і трансплантації. У даній роботі проведено порівняння результатів гістологічних досліджень аллотрансплантації нативних і криоконсервованих неонатальних сім'яників. Показано, що використання контрольованих швидкостей охолодження під час криоконсервувannya і захисного розчину на основі 5 мг/мл бичачого сироваткового альбуміну; 0,05 М сахарози; 20 мМ HEPES; 1,5 М диметилсульфоксиду в якості криопротектора в середовищі DMEM/F12 із подальшою інтратестикулярною аллотрансплантацією неонатального сім'яника щура сприяло розвитку інтерстицію та гермінативного епітелію донорського органа в організмі реципієнта.

Ключові слова: сім'яник, інтратестикулярна аллотрансплантація, криоконсервувannya, імуносупресія, імунологічна привілейованість.

Abstract: Cryopreservation and transplantation of testicular fragments and cells are utilized in establishing the germplasm bank of endangered species, line-breeding of animals. Moreover, the transplantation of testicular tissue is involved into investigation of the inborn and acquired defects of testicular tissue. Thus the improvement of cryopreservation and transplantation methods is of great interest. Here, we have compared the findings of histological examination of allotransplanted native and cryopreserved neonatal testis. It has been shown that the usage of DMEM/F12 supplemented with 5 mg/ml bovine serum albumin, 0.05 M sucrose, 20 mM HEPES, 1.5 M dimethylsulfoxide as a cryoprotectant, controlled cooling, preservation at -196°C , water bath warming, followed by intratesticular allotransplantation of neonatal rat testis results in the development of testicular interstitium and spermatogenic epithelium of donor organs into recipient's body.

Key words: testis, intratesticular allotransplantation, cryopreservation, immune suppression, immune privilege.

Криоконсервирование тестикулярной ткани исчезающих видов животных, а также пород, имеющих важное сельскохозяйственное значение, необходимо при создании банков гермоплазмы [27, 33]. Последующее культивирование *in vitro* или трансплантацию тестикулярной ткани применяют с целью получения зрелых сперматогонимальных клеток, способных к оплодотворению и готовых для использования в селекционной ра-

Cryopreservation of testicular tissue of endangered animal species and breeds having a tremendous agricultural value necessitates the establishment of germplasm banks [27, 33]. Subsequent *in vitro* cultivation and/or transplantation of testicular tissue is applied in assisted reproductive technologies and selection when mature spermatogonial cells capable of fertilization are necessary to obtain [11]. Furthermore, the transplantation is used for breeding

¹Хенанський Університет Науки і Технології, Лоян, КНР

²Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків

³Державна установа «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І.

Мечникова Національної академії медичних наук України», Харків

¹Henan University of Science and Technology, Luoyang, PRC

²Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

³SI 'I.I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of the National Academy of Medical 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: aleksandr.pakhomov2017@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: aleksandr.pakhomov2017@gmail.com

Надійшла 17.01.2019

Прийнята до друку 11.02.2020

Received 17, January, 2019

Accepted 11, February, 2020

© 2020 O.V. Pakhomov, 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.

боте или репродуктивных технологиях [11]. Кроме того, трансплантацию используют для разведения мутантных или трансгенных линий животных с летальным постнатальным фенотипом, а также для исследования врожденных дефектов тестикулярной ткани *in vivo* [27].

На сегодняшний день криоконсервирование тестикулярной ткани перед проведением химиотерапии рассматривается как один из способов сохранения фертильности у онкологических больных препубертатного возраста [35]. У таких больных в 30% случаев развивается бесплодие, связанное с гонадотоксичностью препаратов [24]. Наиболее доступным, эффективным и общепринятым методом сохранения мужской фертильности является криоконсервирование сперматозоидов [22]. Однако для препубертатных пациентов, у которых отсутствует активный сперматогенез, получение эякулята не представляется возможным [32]. Это актуализирует вопрос сохранения их фертильности и, соответственно, качества жизни путем криоконсервирования фрагментов гонад.

Сохранение фрагментов тестикул показано постпубертатным пациентам, поскольку лечение, предшествующее химио- или радиотерапии и злокачественность самой опухоли, приводит к азооспермии [5, 25]. Кроме того, сохранение фрагментов тестикул рекомендуется больным с системными или гематологическими патологиями (миелодисплазия, серповидноклеточная анемия, апластическая анемия, талассемия, ювенильный идиопатический артрит, системная красная волчанка, системный склероз, иммунные цитопении), которым также предписана химиотерапия [6]. Криоконсервирование гонад и их фрагментов показано пациентам с синдромом Клайнфельтера [21], крипторхизмом [18], делецией в AZF-локусе Y-хромосомы, вызывающей раннее развитие азооспермии [17], а также пациентам, которым предписана гонадэктомия [13], трансгендерным женщинам, не достигшим спермархе, или взрослым трансгендерным женщинам, которые не хотят прерывать гормональную терапию, опасаясь появления вторичных мужских половых признаков [19].

Трансплантация клеток и тканей мужской половой железы может быть использована при лечении гипогонадизма и для компенсации андрогенного дефицита [4, 16].

В настоящее время не разработан общий протокол криоконсервирования тестикул и их фрагментов для использования в мировой клинической практике [23]. Однако существует достаточное количество экспериментальных данных

the mutant and transgenic animals with lethal postnatal phenotype and for investigation of inborn defects of testicular tissue *in vivo* [27].

Currently cryopreservation of testicular tissue before chemotherapy is considered as the way to preserve fertility in prepubertal patients [35]. Such patients percentage suffer from infertility due to gonadotoxicity of antitumor drugs in 30 of cases [24]. The most available way of fertility preservation for men is sperm collection and cryopreservation [22]. However, it is not an option for prepubertal patients not having an active spermatogenesis [32]. This makes relevant the issue of preserving fertility and life quality in such patients via gonadal fragment preservation.

The strategy of preserving testicular fragments is also actual for postpubertal patients as far as the treatment that precedes chemo- and radiotherapy as well as the malignancy of tumor itself lead to azoospermia [5, 25]. Moreover, the preservation of testicular fragments is recommended for the patients with systemic or hematological pathologies (myelodysplasia, sickle cell anemia, aplastic anemia, thalassemia, juvenile idiopathic arthritis, systemic lupus erythematosus, systemic sclerosis, immune cytopenia) for whom the chemotherapy is also prescribed [6]. Cryopreservation of gonads and their fragments can be also beneficial for the patients suffering from Klinefelter syndrome [21], cryptorchidism [18], deletion in the AZF-locus of the Y-chromosome, causing early development of azoospermia [17] as well as for those who were prescribed with orchiectomy [13], for transgender women not reaching spermarche or for mature transgender women, who not willing to interrupt a hormone therapy because of fear of appearance of secondary sexual characteristics [19].

Testicular cell and tissue transplantation can be utilized for treatment of hypogonadism and for compensation of androgen deficiency [4,16].

Up to date, no common protocol for cryopreservation of testes and their fragments has been developed and introduced into world clinical practice yet [23]. However, there are lots of experimental data on cryopreservation of human and animal testicular fragments. Some researchers comparatively analyzed the cryoprotective media, among which the most effective occurred to be the solutions supplemented with dimethylsulphoxide (DMSO). V. Keros *et al.* [15] has proven the efficiency of protective medium that contained DMSO, sucrose, bovine serum albumin and some other components, when using the programmable cooling, which comprises the crystallization initiation at -8°C , gradual cooling down to -80°C with varied cooling

по криоконсервированию фрагментов тестикул животных и человека. В ряде работ проведен сравнительный анализ защитных сред, среди которых наиболее эффективным является раствор, включающий диметилсульфоксид (ДМСО). Так, V. Keros и соавт. [15] доказали эффективность защитной среды, включающей ДМСО, сахарозу, бычий сывороточный альбумин (БСА) и некоторые другие компоненты, программируемого охлаждения с инициацией кристаллообразования при -8°C , ступенчатого охлаждения до -80°C и разных скоростей охлаждения в различных температурных интервалах с последующим погружением и хранением в жидком азоте. Успешные результаты применения подобных способов криоконсервирования фрагментов тестикул животных и человека были представлены в работах Y. Vaert и соавт. [1], а также K. Jahnukainen и соавт. [12].

Следует отметить, что способы получения из криоконсервированных фрагментов тестикул сперматогенных клеток, способных к оплодотворению, находятся на стадии разработки. Предложено лишь несколько экспериментальных подходов получения сперматогенных клеток: дозревание тестикул *in vitro*; аутотрансплантация или реимплантация фрагментов и клеток тестикул после химио- или радиотерапии; ксенотрансплантация фрагментов с последующей экстракцией зрелых сперматозоидов. Однако зрелые сперматозоиды человека в условиях дозревания *in vitro* и ксенотрансплантации до сих пор получены не были [6, 10]. Аутотрансплантация имеет ряд преимуществ по сравнению с двумя вышеупомянутыми подходами, но она не применима для сохранения исчезающих видов, пород и линий животных, а также для исследования тестикулярной ткани *in vivo*. Кроме того, при аутотрансплантации возможен риск переноса трансформированных раковых клеток больному [7–9]. Основными недостатками ксенотрансплантации тестикул являются высокий риск переноса инфекций от одного вида животных другому и от животных человеку, эпигенетические изменения в ткани реципиента, а также несовместимость гормонального фона реципиента и донора [2, 9, 11], вызывающими нарушение сперматогенеза. Следует отметить, что в настоящее время существуют единичные результаты, посвященные аллотрансплантации фрагментов с целью получения сперматозоидов для репродуктивных технологий или разведения мутантных и трансгенных линий животных с летальным постнатальным фенотипом. Большинство исследований проведено с использованием иммунодефицит-

rates at certain intervals of temperature, subsequent plunging into liquid nitrogen and storage at -196°C . The successful results of similar regimens for animal and human testes cryopreservation have been shown by Y. Beart *et al.* [1] and K. Jahnukainen *et al.* [12].

It is worth noting that the methods, enabling to obtain from the cryopreserved testicular fragments the spermatogonial cells capable of fertilization, are still in progress. There were several approaches proposed such as: *in vitro* maturation of testicular cells; autotransplantation or reimplantation of testicular fragments and cells after chemo- and radiotherapy; xenotransplantation of fragments with subsequent extraction of mature spermatozoa. However, mature human spermatozoa have not been obtained yet by *in vitro* maturation and xenotransplantation [6, 10]. Autotransplantation has certain advantages comparing to *in vitro* maturation and xenotransplantation but it can hardly be applicable for preservation of endangered animal species and in line-breeding as well as for investigation of testicular tissue *in vivo*. Furthermore, there is a high risk of transferring the malignant cells back to the patients [7–9]. The main disadvantages of testes xenotransplantation are a poor risk of infection transfer from one species to another and from animals to human beings, epigenetic changes in recipient's tissue, as well as the incompatibility of hormonal secretion of recipient and donor [2, 9, 11] that may affect spermatogenesis. It is important to emphasize the scanty current data devoted to testicular fragment allotransplantation for harvesting spermatozoa to be applied in the assisted reproductive technologies and for breeding the mutant and transgenic lines with lethal postnatal phenotype. The majority of researches has been performed using the immune deficit animals [34] and/or auto- or syngeneic transplantation of testicular fragments and cells [28]. This fact remains the issue dealing with allotransplantation open.

This research goal was to compare the results of orthotopic allotransplantation of native and cryopreserved neonatal rat testis.

Materials and methods

The experiments were carried out in white outbred male rats, housed in the animal facility of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine. The experiments were performed in accordance with the Law of Ukraine 'On the Protection of Animals Against Cruelty' (No. 3447–IV of February 21st, 2006), in compliance with the requirements



ных животных [34], на моделях ауто- или сингенной трансплантации фрагментов и клеток тес-тикул [28], что оставляет открытым вопрос об использовании аллотрансплантации.

Цель работы – сравнить результаты ортотопической аллотрансплантации нативных и криоконсервированных неонатальных семенников крыс.

Материалы и методы

Эксперименты выполняли на белых беспородных крысах-самцах, содержащихся в условиях вивария Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (ИПКиК НАН Украины, г. Харьков). Эксперименты были проведены в соответствии с Законом Украины «О защите животных от жестокого обращения» (№ 3447-IV от 21.02.2006) при соблюдении требований Комитета по биоэтике Института, согласованных с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

Реципиентами при трансплантации семенников были взрослые 5–6-месячные самцы, которых разделили на группы: 1 – трансплантация с иммуносупрессией (ИС) нативных неонатальных семенников; 2 – трансплантация без ИС нативных неонатальных семенников; 3 – трансплантация с ИС криоконсервированных неонатальных семенников без удаления криопротектора; 4 – трансплантация с ИС криоконсервированных неонатальных семенников после размораживания и удаления ДМСО.

Донорами были новорожденные животные в возрасте до 24 ч. Органы непосредственно после извлечения помещали в криоампулы объемом 1,8 мл («Nunc», Дания) с 1 мл криоконсервирующего раствора, содержащего 1,5 ДМСО («Галичфарм», Украина); 0,05 М сахарозы (НПО «Реагент», Россия); 20 мМ HEPES («Sigma», США); 5 мг/мл БСА («Sigma», США) в среде DMEM/F12 («Biowest», Австрия). Время экспозиции составляло 10 мин при температуре 4°C. Процедуру охлаждения осуществляли с помощью программируемого замораживателя ЗП-10 (ОП при ИПК и К НАН Украины) в несколько этапов: 1 – охлаждение со скоростью 1 град/мин от 4 до 0°C с последующей температурной остановкой 5 мин; 2 – охлаждение со скоростью 0,5 град/мин до температуры –8°C с последующей температурной остановкой 15 мин; 3 – охлаждение со скоростью 0,5 град/мин до температуры –40°C с последующей температурной остановкой 10 мин; 4 – охлаждение со скоростью 7 град/мин до температуры –80°C с последую-

of the Bioethics Committee of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, agreed to the statements of European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

The 5–6-month male rats were used as recipients. They were subdivided into groups: 1 – immune suppressed animals were transplanted with neonatal testes; 2 – animals were transplanted with neonatal testes without immune suppression (IS); 3 – immune suppressed animals were transplanted with cryopreserved neonatal testes without removal of cryoprotective agent; 4 – immune suppressed animals were transplanted with cryopreserved neonatal testes (DMSO was removed after warming).

The 24-hour rats were used as donors. Immediately after isolation the donor organs were placed into 1.8 ml cryocontainer (Nunc, Denmark) with 1 ml of cryopreservation solution supplemented with 1.5 ml DMSO (Galychpharm, Ukraine); 0.05 M Sucrose (NPO Reagent, Russia); 20 mM Hepes (Sigma, USA), 5 mg/ml BSA (Sigma, USA) in DMEM/F12 (Biowest, Austria). Donor testes were left for 10 min at 4°C. Cooling was fulfilled with programmable freezer ZP-10 (Special Designing and Technical Bureau with Experimental Unit). Cooling included a number of steps: 1 – cooling ramp, 1 deg/min from 4 to 0°C followed by a 5-minute hold; 2 – cooling ramp, 0.5 deg/min to –8°C followed by a 15-minute hold; 3 – cooling ramp, 0.5 deg/min to –40°C followed by a 10-minute hold; 4 – cooling ramp, 7 deg/min to –80°C followed by a 10-minute hold; 5 – plunging into liquid nitrogen.

Samples were warmed at 36°C in water bath up to a complete disappearance of ice. Group 3 animals were transplanted with donor organs immediately after warming without removal of cryoprotective agent. Maximal dosage of DMSO made 0.5 µg/kg of body mass. Group 4 animals were underwent transplantation after the removal of DMSO from grafts. To remove cryoprotective agent the organs in cryopreservation solution were transferred into 15 ml test tubes and 500 µl of DMEM/F12 were added to the test tubes every 2 minutes up to 5 ml final volume.

Ischemia time was up to 10 min till native organs were transplanted. In case of cryopreserved organs, the time interval between warming (or DMSO removal in group 4) did not exceed 10 min.

The transplantation was performed under general anesthesia: 7.5 mg / kg of animal mass tiletamine hydrochloride, 7.5 mg / kg of animal mass zolazepam hydrochloride (Zoletil, «Virbac», France), 20 mg / kg



щей температурной остановкой 10 мин; 5 – погружение в жидкий азот.

Образцы отогревали на водяной бане (36°C) до исчезновения кристаллов льда. Животным группы 3 трансплантировали органы, непосредственно взятые после отогрева, без отмывания от криопротектора. Максимальная вводимая при трансплантации расчетная доза чистого ДМСО составляла 0,5 мг/кг массы животного. Для животных группы 4 проводили процедуру удаления компонентов криоконсервирующего раствора из донорских органов. Для этого органы вместе с криоконсервирующим раствором переносили в пробирку объемом 15 мл и с интервалом 2 мин добавляли по 500 мкл DMEM/F12 до конечного объема 5 мл. Затем органы переносили в раствор DMEM/F12.

При трансплантации нативных органов время ишемии составляло не более 10 мин, а при трансплантации криоконсервированного материала время после отогрева органов (или удаления компонентов криоконсервирующей среды в группе 4) не превышало 10 мин.

Трансплантацию проводили под общей анестезией: 7,5 мг/кг массы животного тилетамина гидрохлорида; 7,5 мг/кг массы животного золазепама гидрохлорида (золетил, «Virbac», Франция); 20 мг/кг массы животного ксилазина гидрохлорида (седазин, «Biowet», Польша). Перед трансплантацией кожу на брюхе животного дезинфицировали 70%-м спиртом, затем делали вертикальный разрез кожи и мышц передней брюшной стенки. Левый семенник аккуратно выводили наружу и хирургической иглой под микроскопом делали прокол белочной оболочки, избегая повреждения сосудов. Через прокол пинцетом помещали донорские неонатальные семенники (3–4 неонатальных семенника на одного реципиента), затем орган аккуратно переносили в брюшную полость. Края брюшной полости ушивали послойно и дезинфицировали 3%-м раствором йода.

За день до трансплантации животным групп 1, 3 и 4 *per os* вводили разовую дозу (20 мг/кг массы тела) иммуносупрессанта циклоспорина («Экворал» Pharmaceuticals s.r.o., Чехия). После трансплантации доза циклоспорина снижалась до 10 мг/кг (ежедневно, 6 дней в неделю), объем вводимого *per os* раствора составлял 1 мл.

Для изучения состояния трансплантата проводили гистологическое исследование через 4 недели после аллотрансплантации. Поскольку данный срок достаточен для формирования сперматоцитов, это позволяет оценить способность сперматогенного эпителия к пролиферации.

of animal mass xylazine hydrochloride (Sedazine, Biowet, Poland). Abdominal skin was disinfected before transplantation with 70% ethyl alcohol then a longitudinal cut of skin and muscles of front abdominal wall was done. Left testis was exposed outside. After that the *tunica albuginea* was pierced and the graft was placed into the testis parenchyma through the puncture. Four testes of newborn rats were used per one experimental animal. The left testis with grafts was placed back into the abdominal cavity. Finally, the muscles and skin were layer-by-layer sutured.

Animals of groups 1, 3 and 4 were given a single dose of cyclosporine (Equoral Pharmaceuticals s.r.o., Czech Republic) as immune suppressor (20 mg/kg of animal body weight *per os*). After that the dosage was down-titrated to 10 mg/kg of animal body weight daily (6 times per week). The volume of the injected *per os* solution came to 1 ml.

Allografts were histologically examined four weeks after transplantation. As far as the term is sufficient for spermatocytes formation, the research enabled us to assess the ability of spermatogenic epithelium to proliferate.

Organs were fixed with 10% formaldehyde. After dehydration and degreasing in alcohol and xylene solutions, the organs were embedded in paraffin. Paraffin sections were cut at 5 micrometer, stained with hematoxylin and eosin, and fuchsine, phosphomolybdic acid, aniline blue, orange G (Mallory's staining) for collagen, elastin and muscle fiber detection. Histological samples were observed with a light microscope Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Germany). The preservation rate of grafts was assessed and the presence of structural components of seminiferous tubules, Sertoli cells and spermatogenic epithelium was determined.

Results and discussion

Histological examination of neonatal testis showed that it consisted of immature seminiferous tubules of 20–30 μm diameter (Fig. 1A). Spermatogonia were located at the tubule center (Fig. 1B). Primitive Sertoli cell and singular gonocytes/prospermatogonia were situated at the periphery of seminiferous tubules and close to the basal membrane. The lumen of seminiferous tubules was absent. Loose connective tissue was found in between the seminiferous tubules. It occupied more than a half of the area of cross-section. The bundles of collagen fibers were occasionally located around the tubules. Apart from neonatal testis the histological structure of mature one showed considerably larger diameter of seminiferous tubules about 250–300 μm (Fig. 1C). The mature Sertoli cells were



Органы животных фиксировали в 10%-м нейтральном формалине. После обезвоживания и обезжиривания в растворах спирта и ксилола органы заливали парафином. Из парафиновых блоков получали гистологические препараты толщиной около 5–7 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином. Дополнительно препараты окрашивали фуксином, фосфорномолибденовой кислотой, анилиновым синим, оранжевым G (по Маллори) для выявления наличия в препарате коллагеновых, эластиновых и мышечных волокон. Гистологические образцы исследовали с помощью микроскопа «Axio Observer Z1» («Carl Zeiss», Германия). Оценивали степень сохранности трансплантата, определяли наличие структурных компонентов семенного канальца, клеток Сертоли и герминативного эпителия.

Результаты и обсуждение

При исследовании гистологической структуры неонатального нативного семенника установлено, что он состоял из зачатков семенных канальцев диаметром 20–30 мкм (рис. 1, А). В центре канальца находились сперматогонии (рис. 1, В), ближе к периферии – примитивные клетки Сертоли, прикрепленные к базальной мембране, и одиночные гоноциты/просперматогонии, просвет канальца отсутствовал. Между канальцами располагалась рыхлая интерстициальная ткань, которая занимала больше половины площади среза. Вокруг канальцев местами располагались пучки коллагеновых волокон. В отличие от неонатального семенника гистологическая структура зрелого семенника имела значительно больший диаметр семенных канальцев 250–300 мкм (рис. 1, С). По периферии канальца располагались зрелые клетки Сертоли, формирующие гематотестикулярный барьер. В семенных канальцах представлены все генерации герминативных клеток: сперматогонии, сперматоциты 1 и 2 порядков, сперматиды и сперматозоиды. Канальцы были разделены узкими полосками хорошо васкуляризированной интерстициальной ткани, заполненной интерстициальными клетками (клетками Лейдига и иммунными клетками), которые плотно прилегали друг к другу. В интерстиции также присутствовали коллагеновые и эластиновые волокна (рис. 1, D).

Через 4 недели после трансплантации нативного семенника у животных группы 1 отмечалось развитие донорской ткани (рис. 2, А), диаметр его семенных канальцев составлял 80–130 мкм. Между канальцами располагалась интерстициальная ткань, структура которой была сходна с

found close to periphery and formed the blood-testis barrier. Seminiferous tubules also represented all generations of germ cells, *i. e.* spermatogonia, primary and secondary spermatocytes, spermatids, spermatozoa. Seminiferous tubules were divided by a thin layer of interstitial tissue which was well vascularized and comprised the Leydig and immune cells, which were closely adjacent to one other. The interstitium had collagen and elastin fibers (Fig. 1D).

Transplantation of native donor tissue in group 1 resulted in its development by week 4 (Fig. 2A). The seminiferous tubules were of 80–130 μm in diameter. The interstitial tissue was situated in between them. Its structure was similar to that of adult animals. The majority of seminiferous tubules had only Sertoli cells and spermatogonia. Some tubules had spermatocytes. At the center of many seminiferous tubules the lumen was clearly observed. The formation of connective tissue and collagen fibers occurred in between the tubules (Fig. 2B).

Animals of group 2 that did not get an immune suppression had another histological appearance, *i. e.* 80–90% of cross section was represented by connective tissue (Fig. 2C). The tissue contained very well structured collagen fibers (Fig. 2D). The remaining part of the cross section showed the degraded seminiferous tubules which had calcifications at their centers.

There are many experimental data covering immune privilege of testis in term of their ability to prolong the graft functioning [36]. Immune suppression induced by cyclosporine facilitated graft survival and even maintained proliferation of the spermatogenic epithelial cells up to the spermatocyte formation stage. Of note is the fact that in intratesticular transplantation it is possible to reduce the dose of immune suppression, however, the assumption has to be supported with additional investigations to confirm. Cryopreserved neonatal testis transplantation were further studied using the immune suppression.

Figure 3, A and B represent the microphoto of cryopreserved neonatal testis transplanted to the animals of group 3 immediately after warming without removal of cryoprotective medium components. It was shown that seminiferous tubules and spermatogenic epithelium were developing by week 4 after transplantation of both native and cryopreserved testes (Fig. 3A and C). Considerable part of seminiferous tubules was lined with Sertoli cells and spermatogonia. Some tubules had spermatocytes. No distinctions were found between group 4 where cryoprotectant was removed and group 3 where this was not done before transplan-



таковой у взрослых животных. В большинстве семенных канальцев располагались только клетки Сертоли и сперматогонии. В некоторых канальцах наблюдались сперматоциты. В центре многих канальцев отчетливо определялся просвет, а между ними – формирование соединительной ткани и коллагеновых волокон (рис. 2, В).

Иная картина наблюдалась у животных группы 2 без ИС: около 80–90% площади среза транс-

татации. An interstitial tissue possessed some mature traits. There was less amount of collagen fibers comparing to the groups 1 and 2. Interstitial cells were tightly adjacent to one another (Fig. 3B and D).

The simplicity, low-cost, safety and reliability are the requirements for a successful transplantation and its implementation into practice. That is why the approaches, simplifying the procedures of do-

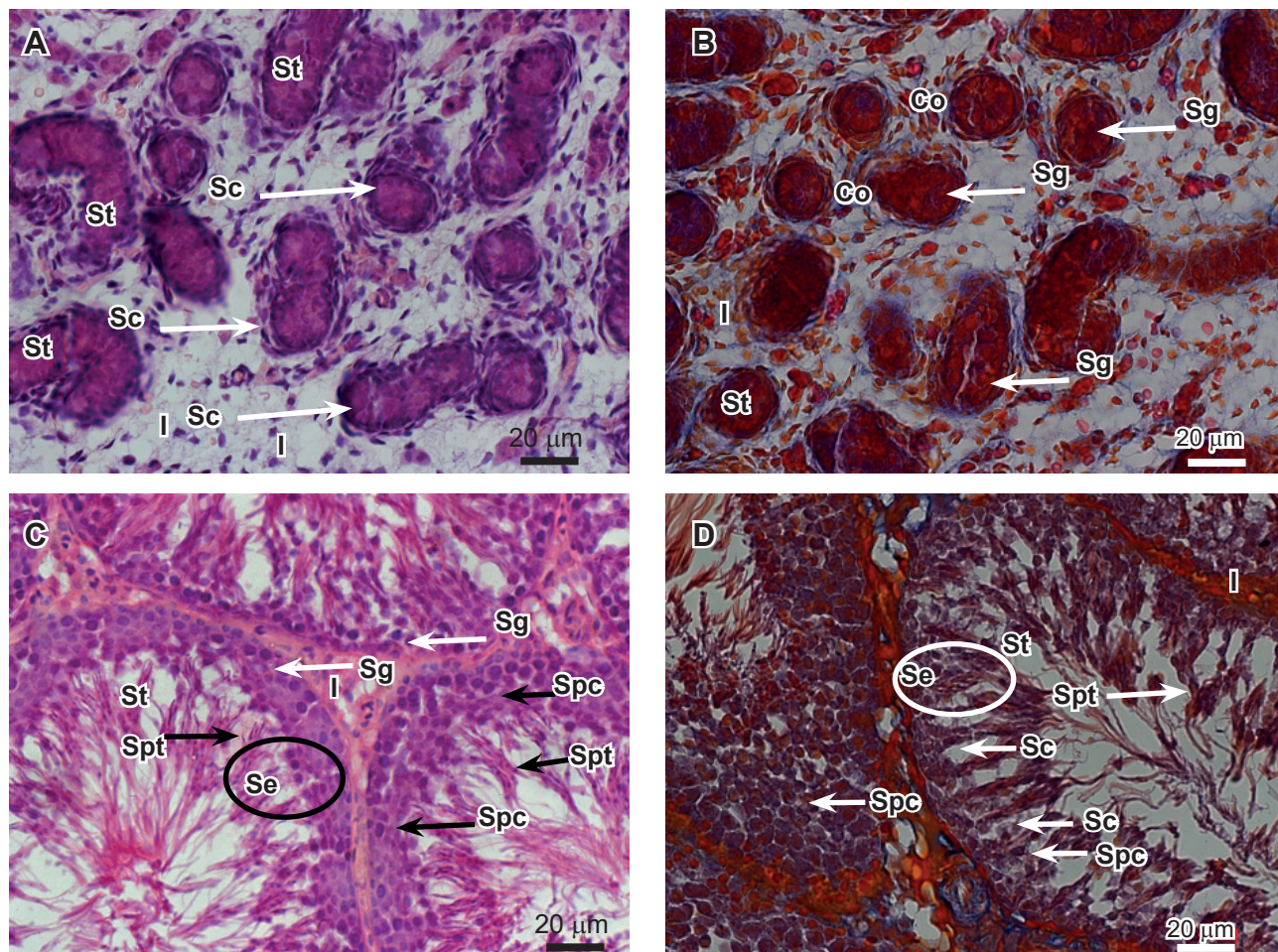


Рис. 1. Гистологическая структура intact neonatal (A, B) и зрелых (C, D) семенников крыс. Окрашивание гематоксилином и эозином (A, C); фуксином, фосфорномолибденовой кислотой, анилиновым синим, оранжевым G по Маллори (B, D). St – семенные канальца; I – интерстиций; Sc – клетки Сертоли; Sg – сперматогонии; Co – коллагеновые волокна (синие); Se – сперматогенный эпителий; Spc – сперматоциты; Spt – сперматиды/сперматозоиды.

Fig. 1. Histological appearance of intact neonatal (A, B) and mature (C, D) testes. Staining: hematoxylin and eosin (A, C); fuchsin, phosphomolybdic acid, aniline blue, orange G (Mallory's staining) (B, D). St – seminiferous tubules; I – interstitium; Sc – Sertoli cells; Sg – spermatogonia; Co – collagen fibers; Se – germinal epithelium; Spc – spermatocytes; Spt – spermatid/spermatozoa.

плантата была представлена соединительной тканью (рис. 2, C), внутри которой находились структурированные коллагеновые волокна (рис. 2, D), ее остальная часть – деградированными семенными канальцами, в центре остатков которых сформировался кальцификат.

Получено большое количество экспериментальных данных, свидетельствующих об имму-

nor organ preparation for transplantation such as DMSO removal are of an evident advantage.

There are many scientific researches devoted to the impact of DMSO on organism. This substance has a very wide-spread clinical application in 10–90% concentrations as anti-inflammatory remedy that facilitates skin graft survival. Negative influences of DMSO were also described for humans [26].

нологической привилегированности семенников с точки зрения их способности увеличивать срок функционирования трансплантата [36]. Иммуносупрессия, вызываемая циклоспорином, способствовала выживаемости трансплантата и даже поддерживала пролиферацию клеток гермина-

They range from mild nausea, diarrhea, fever, hyper- or hypotension to arrhythmia, encephalopathy, renal failure and depressed respiration. Almost all life-threatening effects of DMSO were described for patients, treated for oncology or had insufficiency of bone marrow of various origins [30]. The

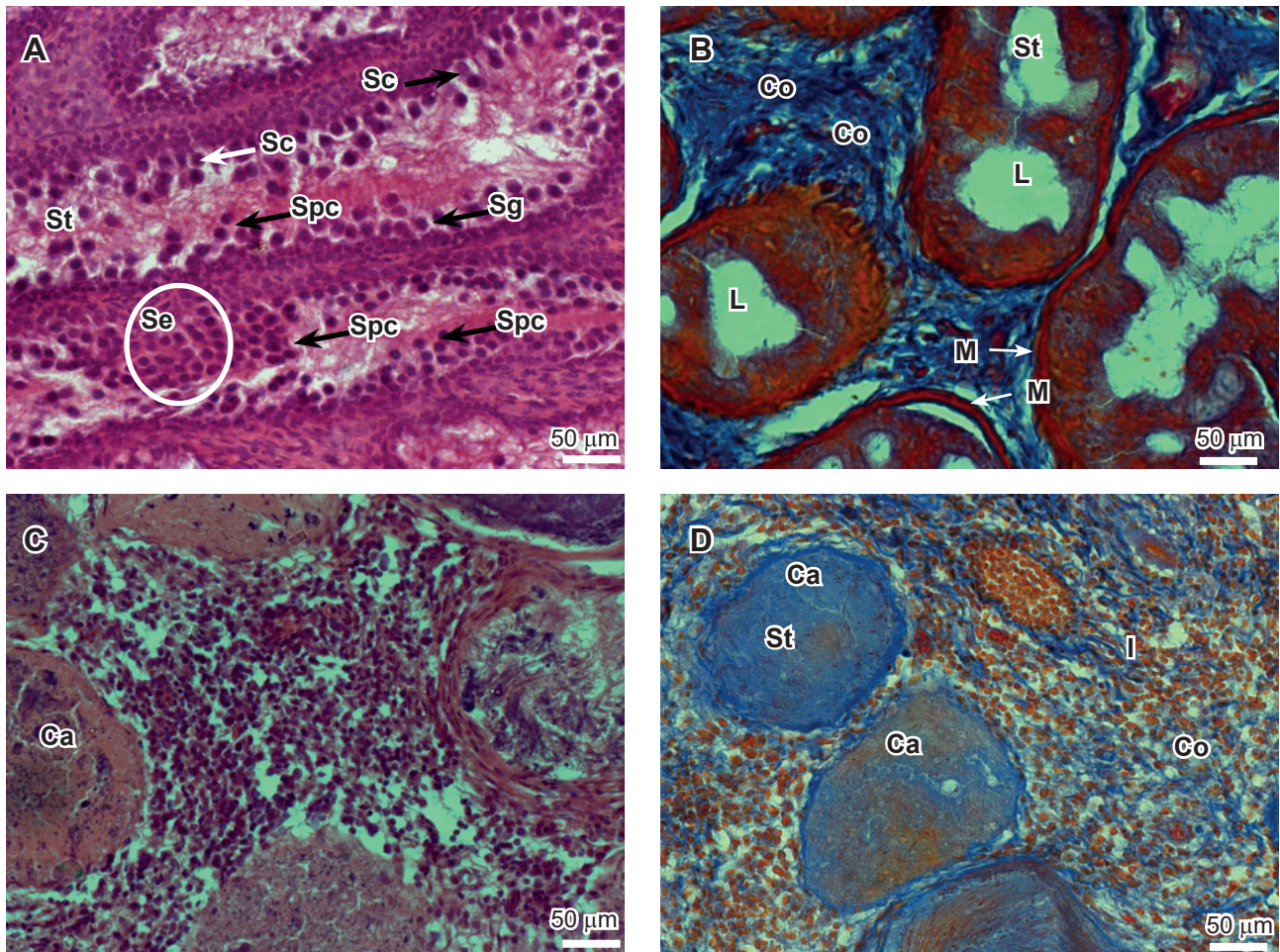


Рис. 2. Гистологическая структура нативных неонатальных семенников крысы через 4 недели после интратестикулярной трансплантации. **A, B** – трансплантат с применением ИС (группа 1); **C, D** – трансплантат без применения ИС (группа 2). Окрашивание гематоксилином и эозином (**A, C**); фуксином, фосфорномолибденовой кислотой, анилиновым синим, оранжевым G по Маллори (**B, D**). St – семенные канальца; I – интерстиций; Sc – клетки Сертоли; Sg – сперматогонии; Co – коллагеновые волокна (синие); Se – сперматогенный эпителий; Spc – сперматоциты; Spt – сперматиды/сперматозоиды; M – миоидные перитубулярные клетки; L – просвет канальца; Ca – кальцификация канальца.

Fig. 2. Histological appearance of native neonatal testes after four weeks of intratesticular transplantation. **A, B** – graft of native testes under immune suppression (group 1); **C, D** – graft of native testis without immune suppression (group 2). Staining: hematoxylin and eosin (**A, C**); fuchsine, phosphomolybdic acid, aniline blue, orange G (Mallory's staining) (**B, D**). St – seminiferous tubules; I – interstitium; Sc – Sertoli cells; Sg – spermatogonia; Co – collagen fibers; Se – germinal epithelium; Spc – spermatocytes; Spt – spermatid/spermatozoa; M – myoid peritubular cells; L – lumen of seminiferous tubules; Ca – calcification of seminiferous tubules.

тивного эпителия (по крайней мере до стадии сперматоцита). Следует отметить, что при интратестикулярной трансплантации возможно снижение дозы иммуносупрессивных препаратов. Однако для подтверждения данного предположения необходимо проведение дополнительных

data about DMSO impact are very contradictory because the patients underwent different type of influences prior to transplantation. The pure singular dose of DMSO administered to human during hematopoietic cell transplantation was 30–60 ml or 0.5–0.8 g/kg of body weight. In neonatal testis

исследований. Дальнейшее изучение трансплантации криоконсервированных неонатальных тестисов проводили с использованием ИС.

На рис. 3, А и В представлена микрофотография криоконсервированного неонатального тестиса трансплантированного животным группы 3 непосредственно после отогрева без удаления компонентов криозащитной среды. Видно, что через 4 недели после трансплантации как нативного, так и криоконсервированного материала, развивались семенные каналцы и герминативный эпителий (рис. 3, А и С). Значительная часть каналцев выстлана клетками Сертоли и сперматогониями. Некоторые каналцы имели сперма-

transplantation the dose made 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of body weight. This is 2,000 time lower than maximally allowed dose for a human, 1 g/kg of body weight. The statement proves the safety of cryopreserved testis use for transplantation without removal of the components of cryoprotective medium.

Testis is well known to be a source of autoantigens because the maturation and development of spermatogenic epithelium occur after establishment of systemic immune protection [20]. Testis is evolutionary able to suppress possible immune response towards its own antigens of spermatogenic epithelium [3]. On the one hand, the result of the process is a peripheral immune tolerance of

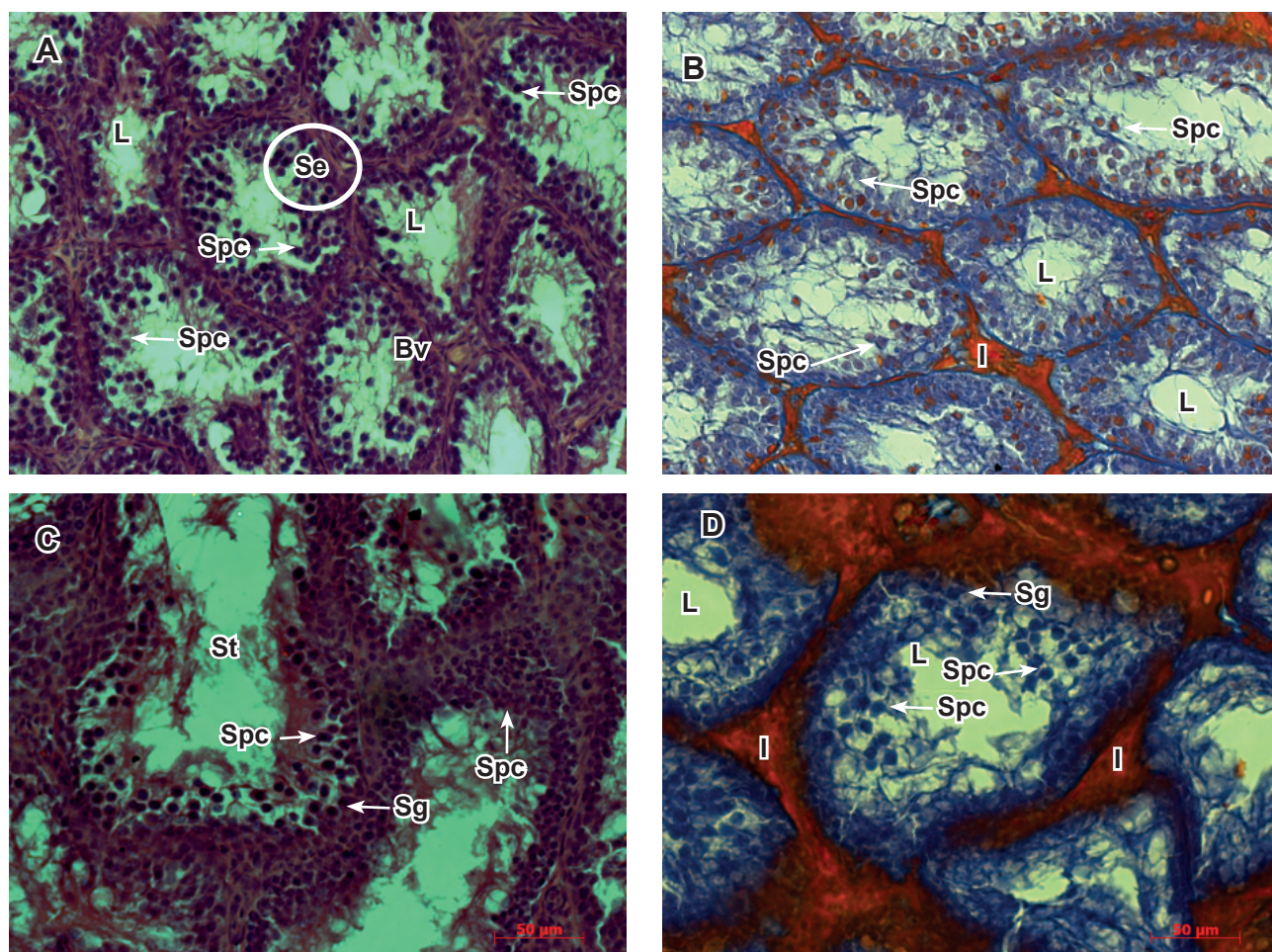


Рис. 3. Гистологическая структура криоконсервированных неонатальных семенников через 4 недели после интратестикулярной трансплантации. **А, В** – трансплантат без удаления криопротектора (группа 3); **С, D** – трансплантат после удаления криопротектора (группа 4). Окрасивание гематоксилином и эозином (**А, С**); фуксином, фосфорномолибденовой кислотой, анилиновым синим, оранжевым G по Маллори (**В, D**). St – семенные каналцы; I – интерстиций; Sc – клетки Сертоли; Sg – сперматогонии; Co – коллагеновые волокна (синие); Se – сперматогенный эпителий; Spc – сперматоциты; Spt – сперматиды/сперматозоиды; M – миоидные перитубулярные клетки. L – просвет каналца; Ca – кальцификация каналца; Bv – кровеносный сосуд.

Fig. 3. Histological appearance of cryopreserved neonatal testes after four weeks of intratesticular transplantation. **A, B** – graft without removal of cryoprotective agent (group 3); **C, D** – graft after removal of cryoprotective agent (group 4). Staining: hematoxylin and eosin (**A, C**); fuchsin, phosphomolybdic acid, aniline blue, orange G (Mallory's staining) (**B, D**). St – seminiferous tubules; I – interstitium; Sc – Sertoli cells; Sg – spermatogonia; Co – collagen fibers; Se – germinal epithelium; Spc – spermatocytes; Spt – spermatid/spermatozoa; M – myoid peritubular cells; L – lumen of seminiferous tubules; Ca – calcification of seminiferous tubules; Bv – blood vessel.

тоциты. Отличий в гистологических препаратах криоконсервированных семенников с удалением криопротектора (группа 4) по сравнению с теми, в которых криопротектор не удалялся (группа 3), не обнаружено. Интерстициальная ткань имела характеристики взрослой: значительно меньшее количество коллагеновых волокон по сравнению с тканью животных групп 1 и 2, плотное прилегание клеток интерстиция друг к другу (рис. 3, В и D).

Необходимым условием успешного проведения трансплантации и внедрения ее в практику является простота, дешевизна, безопасность и надежность. Поэтому подходы, которые упрощают процедуру получения органа для трансплантации, например, исключение дополнительного этапа – удаление ДМСО, имеют явное преимущество.

Существует достаточно большое количество работ, посвященных исследованию влияния ДМСО на организм. Данное вещество имеет широкое клиническое применение в концентрациях 10–90% как противовоспалительное средство, способствующее приживлению кожного трансплантата. Описаны возможные отрицательные воздействия ДМСО на организм человека [26]: от легкой тошноты, диареи, горячки, гипер- или гипотензии до аритмии, энцефалопатии, почечной недостаточности и угнетения дыхания. Практически все угрожающие жизни пациента эффекты ДМСО описаны при трансплантации криоконсервированных гематопоэтических стволовых клеток при лечении разных онкологических заболеваний и недостаточности костного мозга различного происхождения [30]. При этом данные о вкладе именно ДМСО в отрицательные побочные эффекты весьма противоречивы, поскольку больные подвергались разного рода воздействиям перед трансплантацией. Концентрация чистого ДМСО, разово вводимая больному при трансплантации гематопоэтических стволовых клеток, составляет 30–60 мл или 0,5–0,8 г/кг массы тела. В случае трансплантации неонатального семенника доза ДМСО соответствует 0,5 мкг/кг массы животного, что в 2000 раз меньше, чем максимально допустимая разовая доза для человека – 1 г/кг массы [14]. Это обстоятельство доказывает безопасность использования криоконсервированного семенника при трансплантации без удаления компонентов криозащитной среды.

Известно, что семенник – источник аутоантигенов, поскольку созревание и развитие герминативного эпителия происходят после установления системной иммунной защиты [20]. Эволюционно семенник обладает функцией подавления возможного ответа иммунной системы по отношению к собственным антигенам герминативного эпи-

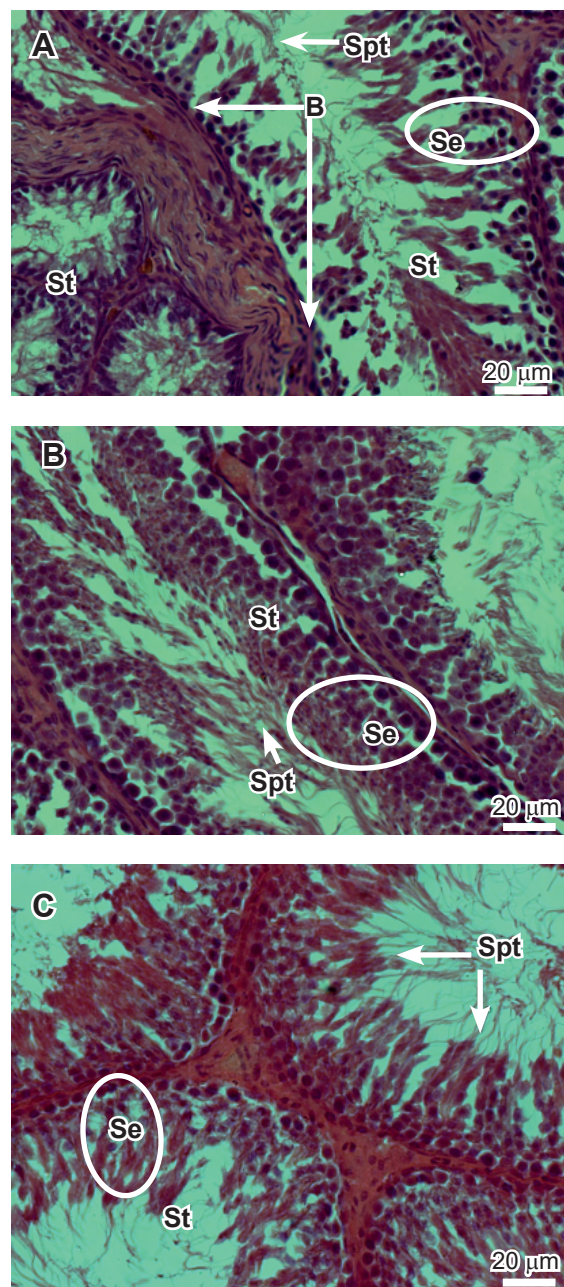


Рис. 4. Гистологическая структура семенников реципиента после трансплантации. **А** – семенной каналец реципиента, прилегающий к трансплантату; **В** – сперматогенный эпителий семенного канальца левого семенника (семенник с трансплантатами) реципиента; **С** – сперматогенный эпителий семенного канальца правого семенника (семенник без трансплантатов) реципиента. Окрашивание гематоксилином и эозином. St – семенные канальца; Se – сперматогенный эпителий; Spt – сперматиды/сперматозоиды; B – соединительнотканная граница между трансплантатом и органом реципиента.

Fig. 4. Histological appearance of recipient testis after four weeks of transplantation. **A** – seminiferous tubule of recipient adjoining to the graft; **B** – germinal epithelium of left testis (with grafts) seminiferous tubule of recipient; **C** – germinal epithelium of right testis (without grafts) seminiferous tubule of recipient. Staining: hematoxylin and eosin. St – seminiferous tubules; Se – germinal epithelium; Spt – spermatid/spermatozoa; B – connective tissue border between graft and recipient organ.

теля [3]. Результатом этого процесса являются, с одной стороны, периферическая иммунная толерантность интерстиция семенника по отношению к собственным антигенам, с другой, – относительная толерантность по отношению к антигенам трансплантата, называемая иммунологической привилегированностью [31].

Важно отметить, что наличие периферической иммунной толерантности семенника не означает, что воспаление не может развиваться в определенных условиях. Нарушения иммунологических свойств семенника в результате инфекционных процессов, травмы, хирургического вмешательства могут приводить к орхиту – аутоиммунным процессам, направленным на собственные герминативные клетки [29]. В связи с этим мы исследовали влияние трансплантации нативных и криоконсервированных семенников на собственные семенники реципиента.

Трансплантация неонатального семенника в целом не нарушала продукцию сперматозоидов собственными семенными канальцами реципиента (рис. 4). В семенных канальцах, прилегающих к трансплантату, наблюдалось нарушение сперматогенеза (рис. 4, А), которое проявлялось в выраженном слущивании герминативного эпителия и визуальном уменьшении количества зрелых сперматозоидов. Гистологическая картина контралатерального семенника животных реципиентов не отличалась от таковой у интактных крыс (рис. 4, В, С). Данный факт свидетельствует об отсутствии генерализованного аутоиммунного поражения семенников реципиента при трансплантации как нативных, так и криоконсервированных семенников.

Выводы

Предложенный режим криоконсервирования неонатальных семенников крыс с использованием среды на основе ДМСО, сахарозы, альбумина, обеспечивал высокую сохранность органа, трансплантированного непосредственно после отогрева без удаления компонентов криозащитной среды. Показано, что результатом интратестикулярной аллотрансплантации неонатального семенника было развитие донорской ткани с формированием сперматозоидов и интерстиция.

Литература

1. Baert Y, Van Saen D, Haentjens, et al. What is the best cryopreservation protocol for human testicular tissue banking? *Hum Reprod.* 2013; 28(7): 1816–26.
2. Chapman LE. Xenotransplantation, xenogeneic infections, biotechnology, and public health. *Mt Sinai J Med.* 2009; 76(5): 435–41.

testicular interstitium towards testicular antigens. On the other hand, there is a relative immune tolerance regarding the graft antigens called as immune privilege [31].

It is noteworthy that the existence of peripheral immune tolerance does not mean the inability of inflammation to develop as long as appropriate conditions were provided. The disturbance of testis immunity as a result of infection, trauma, surgery may lead to orchitis, *i. e.* autoimmune process directed at antigens of own germinal cells [29]. This is the reason why we studied the impact of native and cryopreserved testis transplantation on recipient own testes.

Transplantation of neonatal testis in a whole did not disturb spermatozoa production by seminiferous tubules of recipient (Fig. 4). Seminiferous tubules adjacent to the graft had mild impairment of spermatogenesis (Fig. 4A) which manifested as desquamation of spermatogenic epithelium and perceptible decrease in the amount of mature spermatozoa. The histology of contralateral testis did not differ from that of intact rats (Fig. 4B, C). The fact showed that transplantation of native and cryopreserved testis caused no generalized autoimmune lesion of recipient testis.

Conclusions

The proposed method of cryopreservation for neonatal rat testis that comprised the medium supplemented with DMSO, sucrose, albumin, ensured high preservation of organ transplanted immediately after warming without removal of cryoprotective medium. It was shown that intratesticular allotransplantation of neonatal testes resulted in the development of donor tissue including spermatozoa and interstitium formation.

References

1. Baert Y, Van Saen D, Haentjens, et al. What is the best cryopreservation protocol for human testicular tissue banking? *Hum Reprod.* 2013; 28(7): 1816–26.
2. Chapman LE. Xenotransplantation, xenogeneic infections, biotechnology, and public health. *Mt Sinai J Med.* 2009; 76(5): 435–41.
3. Chen Q, Deng T, Han D. Testicular immunoregulation and spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 2016; 59: 157–65.
4. Deng B, Bondarenko T, Pakhomov O. Changes in sexual behavior of orchidectomized rats under influence of allotransplantation of testicular interstitial cell suspension. *Cell Transplant.* 2017; 26(5): 795–803.
5. Dohle GR. Male infertility in cancer patients: Review of the literature. *Int J Urol.* 2010; 17(4): 327–31.
6. Geens M, De Block G, Goossens E, et al. Spermatogonial survival after grafting human testicular tissue to immunodeficient mice. *Hum Reprod.* 2006; 21(2): 390–6.



3. Chen Q, Deng T, Han D. Testicular immunoregulation and spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 2016; 59: 157–65.
4. Deng B, Bondarenko T, Pakhomov O. Changes in sexual behavior of orchidectomized rats under influence of allo-transplantation of testicular interstitial cell suspension. *Cell Transplant.* 2017; 26(5): 795–803.
5. Dohle GR. Male infertility in cancer patients: Review of the literature. *Int J Urol.* 2010; 17(4): 327–31.
6. Geens M, De Block G, Goossens E, et al. Spermatogonial survival after grafting human testicular tissue to immunodeficient mice. *Hum Reprod.* 2006; 21(2): 390–6.
7. Geens M, Goossens E, De Block G, et al. Autologous spermatogonial stem cell transplantation in man: current obstacles for a future clinical application. *Hum Reprod Update.* 2008; 14(2): 121–30.
8. Geens M, Van de Velde H, De Block G, et al. The efficiency of magnetic-activated cell sorting and fluorescence-activated cell sorting in the decontamination of testicular cell suspensions in cancer patients. *Hum Reprod.* 2007; 22(3): 733–42.
9. Gies I, De Schepper J, Tournaye H. Progress and prospects for fertility preservation in prepubertal boys with cancer. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2015; 22(3): 203–8.
10. Gupta AA, Donen RM, Sung L, et al. Testicular biopsy for fertility preservation in prepubertal boys with cancer: identifying preferences for procedure and reactions to disclosure practices. *J Urol.* 2016; 196(1): 219–24.
11. Holoch P, Wald M. Current options for preservation of fertility in the male. *Fertil Steril.* 2011; 96(2): 286–90.
12. Jahnukainen K, Ehmcke J, Hergenrother SD, et al. Effect of cold storage and cryopreservation of immature non-human primate testicular tissue on spermatogonial stem cell potential in xenografts. *Hum Reprod.* 2007; 22(4): 1060–7.
13. Jahnukainen K, Ehmcke J, Söder O, et al. Clinical potential and putative risks of fertility preservation in children utilizing gonadal tissue or germline stem cells. *Pediatr Res.* 2006; 59(4, Pt 2): 40R–47R.
14. Júnior AM, Arrais CA, Saboya R, et al. Neurotoxicity associated with dimethylsulfoxide-preserved hematopoietic progenitor cell infusion. *Bone Marrow Transplant.* 2008; 41(1): 95–6.
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. Kirpatovskii VI, Efremov GD, Frolova EV. Ectopic organogenesis after allotransplantation of freshly removed or cryopreserved neonatal testicle under the renal capsule in rats. *Bull Exp Biol Med.* 2018; 166(2): 268–73.
17. Krausz C, Forti G. Sperm cryopreservation in male infertility due to genetic disorders. *Cell Tissue Bank.* 2006; 7(2): 105–12.
18. Kvist K, Thorup J, Byskov AG, et al. Cryopreservation of intact testicular tissue from boys with cryptorchidism. *Hum Reprod.* 2006; 21(2): 484–91.
19. Mattawanon N, Spencer JB, Schirmer DA 3rd, Tangpricha V. Fertility preservation options in transgender people: A review. *Rev Endocr Metab Disord.* 2018; 19(3): 231–42.
20. Mueller DL. Mechanisms maintaining peripheral tolerance. *Nat Immunol.* 2010; 11(1): 21–7.
21. Paduch DA, Bolyakov A, Cohen P, Travis A. Reproduction in men with Klinefelter syndrome: the past, the present, and the future. *Semin Reprod Med.* 2009; 27(2): 137–48.
22. Petrushko M.P. [Current state of cryopreservation of reproductive cells and embryos] *Visn Nac Acad Nauk Ukr.* 2017; (7): 44–53. Ukrainian.
23. Picton HM, Wyns C, Anderson RA, et al. ESHRE Task force on fertility preservation in severe diseases. A european perspective on testicular tissue cryopreservation for fertility preservation in prepubertal and adolescent boys. *Hum Reprod.* 2015; 30(11): 2463–75.
24. Rendtorff R, Hohmann C, Reinmuth S, et al. Hormone and sperm analyses after chemo- and radiotherapy in childhood and adolescence. *Klin Padiatr.* 2010; 222(3): 145–9.
25. Sabanegh ES Jr, Ragheb AM. Male fertility after cancer. *Urology.* 2009; 73(2): 225–31.
26. Sánchez-Salinas A, Cabañas-Perianes V, Blanquer M, et al. An automatic wash method for dimethyl sulfoxide removal in autologous hematopoietic stem cell transplantation decreases the adverse effects related to infusion. *Transfusion.* 2012; 52(11): 2382–6.
27. Schlatt S, Honaramooz A, Boiani M, et al. Progeny from sperm obtained after ectopic grafting of neonatal mouse testes. *Biol Reprod.* 2003; 68(6): 2331–5.

24. Rendtorff R, Hohmann C, Reinmuth S, et al. Hormone and sperm analyses after chemo- and radiotherapy in childhood and adolescence. *Klin Padiatr.* 2010; 222(3): 145–9.
25. Sabanegh ES Jr, Ragheb AM. Male fertility after cancer. *Urology.* 2009; 73(2): 225–31.
26. Sánchez-Salinas A, Cabañas-Perianes V, Blanquer M, et al. An automatic wash method for dimethyl sulfoxide removal in autologous hematopoietic stem cell transplantation decreases the adverse effects related to infusion. *Transfusion.* 2012; 52(11): 2382–6.
27. Schlatt S, Honaramooz A, Boiani M, et al. Progeny from sperm obtained after ectopic grafting of neonatal mouse testes. *Biol Reprod.* 2003; 68(6): 2331–5.
28. Schlatt S, Kim SS, Gosden R. Spermatogenesis and steroidogenesis in mouse, hamster and monkey testicular tissue after cryopreservation and heterotopic grafting to castrated hosts. *Reproduction.* 2002; 124(3): 339–46.
29. Schuppe HC, Meinhardt A, Allam JP, et al. Chronic orchitis: a neglected cause of male infertility? *Andrologia.* 2008; 40(2): 84–91.
30. Shu Z, Heimfeld S, Gao D. Hematopoietic SCT with cryopreserved grafts: adverse reactions after transplantation and cryoprotectant removal before infusion. *Bone Marrow Transplant.* 2014; 49(4): 469–76.
31. Simpson E. A historical perspective on immunological privilege. *Immunol Rev.* 2006; 213: 12–22.
32. Suhag V, Sunita BS, Sarin A, et al. Fertility preservation in young patients with cancer. *South Asian J Cancer.* 2015; 4(3): 134–9.
33. Woelders H, Windig J, Hiemstra SJ. How developments in cryobiology, reproductive technologies and conservation genomics could shape gene banking strategies for (farm) animals. *Reprod Domest Anim.* 2012; 47 (4): 264–73.
34. Yildiz C, Mullen B, Jarvi K, et al. Effect of different cryoprotectant agents on spermatogenesis efficiency in cryopreserved and grafted neonatal mouse testicular tissue. *Cryobiology.* 2013; 67: 70–5.
35. Yokonishi T, Ogawa T. Cryopreservation of testis tissues and in vitro spermatogenesis. *Reprod Med Biol.* 2016; 15: 21–8.
36. Zhao S, Zhu W, Xue S, Han D. Testicular defense systems: immune privilege and innate immunity. *Cell Mol Immunol.* 2014; 11(5): 428–37.
28. Schlatt S, Kim SS, Gosden R. Spermatogenesis and steroidogenesis in mouse, hamster and monkey testicular tissue after cryopreservation and heterotopic grafting to castrated hosts. *Reproduction.* 2002; 124(3): 339–46.
29. Schuppe HC, Meinhardt A, Allam JP, et al. Chronic orchitis: a neglected cause of male infertility? *Andrologia.* 2008; 40(2): 84–91.
30. Shu Z, Heimfeld S, Gao D. Hematopoietic SCT with cryopreserved grafts: adverse reactions after transplantation and cryoprotectant removal before infusion. *Bone Marrow Transplant.* 2014; 49(4): 469–76.
31. Simpson E. A historical perspective on immunological privilege. *Immunol Rev.* 2006; 213: 12–22.
32. Suhag V, Sunita BS, Sarin A, et al. Fertility preservation in young patients with cancer. *South Asian J Cancer.* 2015; 4(3): 134–9.
33. Woelders H, Windig J, Hiemstra SJ. How developments in cryobiology, reproductive technologies and conservation genomics could shape gene banking strategies for (farm) animals. *Reprod Domest Anim.* 2012; 47 (4): 264–73.
34. Yildiz C, Mullen B, Jarvi K, et al. Effect of different cryoprotectant agents on spermatogenesis efficiency in cryopreserved and grafted neonatal mouse testicular tissue. *Cryobiology.* 2013; 67: 70–5.
35. Yokonishi T, Ogawa T. Cryopreservation of testis tissues and in vitro spermatogenesis. *Reprod Med Biol.* 2016; 15: 21–8.
36. Zhao S, Zhu W, Xue S, Han D. Testicular defense systems: immune privilege and innate immunity. *Cell Mol Immunol.* 2014; 11(5): 428–37.

