

УДК 57.084.1:591.463.2

В.И. ГРИШЕНКО, В.Е. ЧАДАЕВ\*, В.В. ВОЛИНА, Л.В. БАЦУНОВА

**Изучение влияния аллотрансплантации криоконсервированной тестикулярной ткани на репродуктивную функцию кроликов с гипофункцией яичек**

UDC 57.084.1:591.463.2

V.I. GRISCHENKO, V.YE. CHADAEV\*, V.V. VOLINA, L.V. BATSUNOVA

**Study of Effect of Cryopreserved Testicular Tissue Allotransplantation on Reproductive Function of Rabbits with Testes Hypofunction**

Сперматогенный эпителий чрезвычайно чувствителен к повреждающим факторам (интоксикация, авитаминозы, недостаточность питания и др.), в результате действия которых сперматогенез ослабляется или даже прекращается, а сперматогенный эпителий атрофируется [1]. Аналогичные деструктивные процессы развиваются после перевязки или перерезки семявыводящих каналов, а также при длительной половой абстиненции [2, 6].

Цель работы – изучение влияния трансплантации криоконсервированной тестикулярной ткани на репродуктивную способность кроликов с половой абстиненцией и гипофункцией яичек *per se*, а также в результате применения препарата «Ноофен».

Эксперименты проводили на 20 кроликах-самцах породы Шиншилла 18-месячного возраста массой 3000–3500 г.

Животных содержали в стандартных условиях вивария при температуре 15–17°C и относительной влажности 55–65%. Во время эксперимента наблюдали за самочувствием и поведением животных [5].

Кроликов разделили на экспериментальные группы (n = 5 в каждой): I – кролики-самцы, к которым регулярно подсаживали самок (норма); II – кролики с гипофункцией яичек, содержащиеся без самок в течение 2-х месяцев (контроль); III – кролики, которым после 2-х месяцев содержания без самок проводили аллотрансплантацию криоконсервированной тестикулярной ткани; IV – кролики, содержащиеся без самок в течение 2-х месяцев и получавшие после аллотрансплантации криоконсервированной ткани яичек препарат «Ноофен» («Олайнфарм», Латвия).

Эксперименты проводили в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными II Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2004) и согласованными с положениями «Европейской Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1985).

Материалом для аллотрансплантации криоконсервированной ткани яичек служили фрагменты тестикулярной ткани от здоровых кроликов-самцов [7]. Срок переживания трансплантируемой ткани увеличивали заключением трансплантата в диффузионную

Сперматогенный эпителий is very sensitive to damaging factors (intoxication, vitamin deficiency, hyponutrient *etc.*) as the result of the effect of those the spermatogenesis is weakened or even stopped and spermatogenic epithelium is atrophied [1]. The same destructive processes develop after ligating or cutting of spermatoducts as well as under long sexual abstinence [2, 6].

The research aim is to study the effect of transplantation of cryopreserved testicular tissue on reproductive ability of rabbits with sexual abstinence and testes hypofunction *per se*, as well as in the result of application of “Noophen” preparation.

The experiments were carried-out in 20 male Chinchilla rabbits of 18 months' age of 3,000–3,500 g.

The animals were maintained under standard vivarium conditions at 15–17°C and relative humidity of 55–65%. During the experiment there were monitored the animals' health and behavior [5].

The rabbits were divided into experimental groups (n = 5 in each group): 1 – male rabbits which were regularly contacted females (norm); 2 – rabbits with testes hypofunction, maintained without females for 2 months (control); 3 – rabbits, which 2 months later the maintenance without females were allotransplanted with cryopreserved testicular tissue; 4 – rabbits maintained without females for 2 months and treated with “Noophen” (OlainFarm, Latvia) after allotransplantation of cryopreserved testes tissue.

The experiments were performed in accordance with “General principles of experiments in animals” (Kiev, 2004) and coordinated with the statements of “European convention on protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes” (Strasbourg, 1985).

Material for allotransplantation of cryopreserved tissue of testes served the fragments of testicular tissue from healthy male rabbits [7]. The term of survival of the tissue transplanted was increased by placing the graft into diffusive chamber, the role of which was played by amniotic membrane (semi-permeable membrane), which is non-permeable for immune competent cells (recipient's lymphocytes). The used method significantly weakens the immunological conflict between donor and recipient. The feeding of the transplant placed into diffusive chamber is

Институт проблем криобиологии и криомедицины  
НАН Украины, г. Харьков

\* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:  
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38  
(057) 373-31-19, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта:  
cryo@online.kharkov.ua

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  
3119, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

камеру, роль которой выполняла амниотическая оболочка, являющаяся полупроницаемой мембраной, которая непроницаема для иммунокомпетентных клеток (лимфоцитов реципиента). Этот метод значительно ослабляет иммунологический конфликт между донором и реципиентом. Питание трансплантата, помещенного в диффузионную камеру, осуществляется осмотически за счет диффузии. Трансплантация криоконсервированной тестикулярной ткани в амниотической оболочке существенно не влияет на иммунологические реакции реципиента [4, 9].

Амниотическую оболочку забирали у самок кроликов в период вынашивания потомства. Криоконсервирование фрагментов тестикулярной ткани проводили по разработанному нами методу [7] после тщательного бактериологического контроля препаратов. После деконсервирования трансплантационный материал помещали в стерильные чашки Петри с питательной средой 199 с добавлением антибиотиков.

Фрагменты ткани яичек помещали в амниотическую оболочку и формировали «мешочек» для трансплантации [3]. Применение данной биологической оболочки (мембраны) позволяло пролонгировать функциональную активность тестикулярной ткани, вследствие ослабления эффектов отторжения и лизиса. Сформированный «мешочек» из амниотической оболочки, содержащий 14–18 фрагментов ткани яичек, завязывали кетгутовой лигатурой. После соответствующей обработки операционного поля под местной анестезией 0,5–2,0% раствором новокаина в области наружной стороны бедра производили разрез кожи длиной 2 см и частично острым, частично тупым путем создавали «карман» для погружения трансплантата. При этом трансплантат плотно фиксировали кетгутовой нитью к коже. На края кожной раны накладывали скобки Мишеля.

Для нормализации гипоталамо-гипофизарно-тестикулярной системы кролики в течение 4-х недель после трансплантации криоконсервированной ткани яичек получали ноотропный препарат «Ноофен» в дозе 30 мг в сутки на 3500 г живого веса («Ноофен» разрешен к клиническому применению, утвержден МОЗ Украины от 26.11.06 №778, регистрационное свидетельство № UA37730101).

К кроликам-самцам контрольной группы с половой абстиненцией через 2 месяца, а к кроликам III и IV групп через месяц после произведенной трансплантации криоконсервированной ткани яичек регулярно подсаживали самок.

У животных I группы потомство появилось через 30 дней после случки с самкой, находящейся в состоянии половой охоты. Потомство состояло из 6–9 крольчат живой массой 40–60 г.

Кролики II группы, изолированные от самок в течение 2-х месяцев и у которых по результатам морфологического исследования [6] выявлены деструктивные изменения сперматогенного эпителия яичек, выражающиеся в запустевании извитых семенных канальцев, потомства не имели. При этом у самцов наблюдалось не совсем характерное половое поведение. Они вяло реагировали на самок, хотя эрекция и эякуляция наблюдались, однако у самок оплодотворение не произошло.

Репродуктивная способность кроликов-самцов III и IV групп, которым после 2-месячной изоляции от самок производилась трансплантация криоконсервированной тестикулярной ткани, полностью восстанавливалась, что

implemented osmotically due to diffusion. Transplantation of cryopreserved testicular tissue in amniotic membrane significantly does not affect immunological reactions of a recipient [4, 9].

Amniotic membrane was derived from female rabbits within the period of gestating posterity. Cryopreservation of testicular tissue fragments was carried-out according to our method [7] after careful bacteriological control of the preparation. After thawing the transplantation material was placed into sterile Petri dishes with nutritive medium 199 adding antibiotics.

Testes tissue fragments were placed into amniotic membrane and formed as “a pouch” for transplantation [3]. The application of this biological membrane enabled the prolonging of functional activity of testicular tissue as a result of the weakening of the effects of rejection and lysis. The formed from amniotic membrane pouch, comprising 14–18 fragments of testes tissue was sutured with ligature. After corresponding treatment of operation field under local anesthesia with 0.5–2.0% Novocain solution in the area of exterior hip on the skin there was done 2 cm incision and partially either by acute or blunt way the “pouch” was created to plunge the graft. Herewith the graft was not tightly fixed on skin with catgut thread. The edges of wound were clipped with Michel clips.

To normalize hypothalamus-hypophysis-testicular system the rabbits during 4 weeks after transplantation of cryopreserved testes tissue received the nootropics “Noophen” in a dose of 30 mg a day per 3,500 g of live weight (“Noophen” is registered for clinical application, approved by the Ministry of Health Care of Ukraine dated of 26.11.06 N778, registration certificate UA 37730101).

Females were regularly placed to male rabbits of the control group with sexual abstinence in 2 months and those of the 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> groups in a month after transplantation of cryopreserved testes tissue.

In the animals of the 1<sup>st</sup> group the posterity appeared in 30 days after mating with female being in the estral state. The posterity comprised 6–9 young rabbits of 40–60g live mass.

The rabbits of the 2<sup>nd</sup> group isolated from females for 2 months and in those on the results of morphological study [6] there were revealed destructive changes of testicles’ spermatogenic epithelium manifesting in the emptiness of convoluted seminiferous tubules, had no posterity. Herewith in the males there was observed an odd sexual behavior. They responded slightly to females, but there were found the signs of erection and ejaculation, however there was no fertilization in females.

Reproductive ability of male rabbits of the 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> group, those after 2 months’ isolation from females were grafted with cryopreserved testes tissue, completely recovered, that proved the possible correction of testes hypofunction. Previous morphological studies [8] confirmed the recovery of spermatogenic epithelium and recovery of spermatogenesis in convoluted seminiferous tubules of the testes of animals of these groups. There was obtained the posterity (4–8 young rabbits of average mass of 40–60g) from the animals of the mentioned groups.

Herewith the posterity from the animals of the 4<sup>th</sup> group which during 4 weeks after transplantation of testes tissue received nootropics “Noophen” was bigger by 1–2 individuals than in those of the 3<sup>rd</sup> group (Table).

Thus, the method of allotransplantation of cryopreserved testicular tissue enables to correct the reduction of

доказывает возможность коррекции гипофункции яичек. Предыдущими морфологическими исследованиями [8] подтверждалось восстановление сперматогенного эпителия и возобновление сперматогенеза в извитых семенных канальцах яичек животных этих групп. От животных указанных групп после случки с половозрелыми самками было получено потомство (4–8 крольчат со средней массой 40–60 г).

При этом потомство от животных IV группы, которые в течение 4-х недель после трансплантации ткани яичек получали ноотропный препарат «Ноофен», было на 1–2 особи больше, чем у кроликов III группы (таблица).

Таким образом, метод аллотрансплантации криоконсервированной тестикулярной ткани позволяет корректировать снижение функции яичек у кроликов и восстанавливает их репродуктивную функцию. Ноотропный препарат «Ноофен» усиливает эффект, полученный при трансплантации.

### Литература

1. *Ендовицкая И.П., Зиновьева Н.А., Эрнст Л.К.* Динамика сперматогенеза у кролика *Oryctolagus cuniculus* // Цитология.– 2005.– Т. 47, №1.– С. 44–48.
2. *Сперматогенез и его регуляция* / Под ред. Л.В. Данилова.– М.: Наука, 1983.– 232 с.
3. *Чадаев В.Е., Демина Л.Г., Чуб Н.Н.* Методика аллотрансплантации криоконсервированной овариальной ткани // Актуальные вопросы физиологии и патологии репродуктивной функции женщины: Сб. статей.– Харьков, 1986.– С. 61–63.
4. *Чадаев В.Е.* Аллотрансплантация криоконсервированной овариальной ткани в амниотической оболочке как метод коррекции при эндокринном бесплодии: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.– Харьков, 1988.– 23 с.
5. *Чадаев В.Е., Добрунова И.В.* Изучение влияния срока половой абстиненции на поведенческие реакции у кроликов. Первое сообщение // Клінічна та експериментальна патологія.– 2006.– Т. 5, №4.– С. 93–95.
6. *Чадаев В.Е., Волина В.В.* Изучение влияния срока половой абстиненции на морфофункциональное состояние семенников кроликов. Второе сообщение // Клінічна та експериментальна патологія.– 2007.– Т. 6, №2.– С. 76–79.
7. *Чадаев В.Е., Добрунова И.В., Гольцев К.А.* Модельный объект для определения возможности трансплантации криоконсервированной тестикулярной ткани в терапии человека // Вісник проблем біології і медицини.– 2007.– Вип. 3.– С. 24–27.
8. *Чадаев В.Е., Волина В.В.* Изучение влияния аллотрансплантации криоконсервированной тестикулярной ткани на морфофункциональное состояние яичек кроликов // Вісник проблем біології і медицини.– 2008.– Вип. 2.– С. 125–130.
9. *Grischenko V.I., Chadaev V.Y., Dyomina L.G., Lobyntseva G.S.* Immune status of recipient organism following allotransplantation of cryopreserved ovarian tissue in infertility // Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.– 1988.– Vol. 16, N2.– P. 63–64.

Поступила 27.10.2009  
Рецензент Ф.И. Осташко

testes functions in rabbits and recovers their reproductive function. The nootropics “Noophen” strengthens the effect received under transplantation.

Количество крольчат в пометах кроликов экспериментальных групп (n = 5)  
Number of young rabbits in broods of experimental groups (n = 5)

Группы кроликов-самцов Groups of male rabbits	Самки кроликов Female rabbits				
	1	2	3	4	5
I Норма Norm	6	9	8	7	9
II Контроль Control	–	–	–	–	–
III Трансплантация Transplantation	5	4	7	5	6
IV Трансплантация + "Ноофен" Transplantation + Noophen	6	5	7	7	8

### References

1. *Endovitskaya I.P., Zinovyeva N.A., Ernst L.K.* Dynamics of spermatogenesis in rabbit *Oryctolagus cuniculus* // Tsitologiya.– 2005.– Vol. 47, N1.– P. 44–48.
2. *Spermatogenesis and its regulation* / Ed. by L.V. Danilova. – Moscow: Nauka, 1983.– 232 p.
3. *Chadaev V.Ye., Demina L.G., Chub N.N.* Methods of allotransplantation of cryopreserved ovarian tissue // Actual tasks of physiology and pathology of female reproductive functions: Collection of papers.– Kharkov, 1986.– P. 61–63.
4. *Chadaev V.Ye.* Allotransplantation of cryopreserved ovarian tissue in amniotic membrane as the correction method at endocrine infertility: Author's abstract of thesis of candidate of med. sciences.– Kharkov, 1988.– 23 p.
5. *Chadaev V.Ye., Dobrunova I.V.* Study of effect of sexual abstinence term on behavioural reactions in rabbits. First report // Klinichna i Eksperimentalna Patologiya.– 2006.– Vol. 5, N4.– P. 93–95.
6. *Chadaev V.Ye., Volina V.V.* Study of effect of sexual abstinence term on morphofunctional state of rabbit's testes. Second report // Klinichna i Eksperimentalna Patologiya. – 2007.– Vol. 6, N2.– P. 76–79.
7. *Chadaev V.Ye., Dobrunova I.V., Goltsev K.A.* Model object for determination of possible transplantation of cryopreserved testicular tissue in human therapy // Visnyk Problem Biologii i Meditsyny.– 2007.– Issue 3.– P. 24–27.
8. *Chadaev V.Ye., Volina V.V.* Study of effect of allotransplantation of cryopreserved testicular tissue on morphofunctional state of rabbits testes // Visnyk Problem Biologii i Meditsyny.– 2008.– Issue 2.– P. 125–130.
9. *Grischenko V.I., Chadaev V.Y., Dyomina L.G., Lobyntseva G.S.* Immune status of recipient organism following allotransplantation of cryopreserved ovarian tissue in infertility // Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.– 1988.– Vol. 16, N2.– P. 63–64.

Accepted in 27.10.2009