

## Криоконсервирование единичных сперматозоидов человека в составе альгинатных микросфер

А.И. ПРАВДЮК<sup>1,2</sup>, Н.Г. ГРИШЕНКО<sup>2</sup>, Ю.А. ПЕТРЕНКО<sup>1</sup>, А.Ю. ПЕТРЕНКО<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

<sup>2</sup>Клиника репродуктивной медицины им. академика В.И. Грищенко

## Cryopreservation of Single Human Spermatozoa Within Alginate Microbeads

A.I. PRAVDYUK<sup>1,2</sup>, N.G. GRISHCHENKO<sup>2</sup>, YU.A. PETRENKO<sup>1</sup>, A.YU. PETRENKO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

<sup>2</sup>Academician V.I. Grischenko Clinic for Reproductive Medicine, Kharkov, Ukraine

На данный момент разработаны эффективные технологии криоконсервирования сперматозоидов человека, позволяющие сохранять их жизнеспособность и функциональную активность в течение длительного времени. Традиционные подходы ориентированы на криоконсервирование суспензий с относительно большим содержанием сперматозоидов ( $10^3$ – $10^8$ ), при этом умеренные потери клеток допустимы. Вместе с тем существует необходимость криоконсервировать единичные сперматозоиды, отобранные в ходе морфологической селекции сперматозоидов, сохранения спермиев, полученных при тестикулярной биопсии, тяжелых формах олигоспермии и др. В таких случаях потери сперматозоидов в процессе криоконсервирования крайне нежелательны, поскольку могут отрицательно влиять на результаты циклов ВРТ. Поэтому для криоконсервирования единичных сперматозоидов целесообразно использовать специальные микросоносители. Это облегчает обнаружение единичных сперматозоидов после отогрева и практически исключает их количественные потери. Одним из перспективных контейнеров для сперматозоидов являются альгинатные микросферы, которые активно применяются в биотехнологии и тканевой инженерии. Клетки в альгинатных микросферах могут быть криоконсервированы под защитой проникающих криопротекторов. Кроме того, сперматозоиды могут быть легко извлечены из альгинатных микросфер путем их деполимеризации в присутствии хелатирующих агентов, что является преимуществом данного типа носителей и упрощает проведение процедуры ICSI (интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида). В данной работе изучалась возможность криоконсервирования сперматозоидов человека в составе альгинатных микросфер путем замораживания в парах азота.

Подвижные сперматозоиды от 5 доноров помещали с помощью микроманипулятора в альгинатные микросферы, которые криоконсервировали под защитой глицерола в парах азота. Для высвобождения сперматозоидов альгинатные микросферы подвергали деполимеризации. Жизнеспособность сперматозоидов после замораживания в составе альгинатных микросфер оценивали с помощью комбинированного флуоресцентного окрашивания и гипосмотического теста.

Показано, что после отогрева альгинатные микросферы сохраняли структурную целостность, а инкапсулированные в них сперматозоиды были жизнеспособными. Таким образом, криоконсервирование единичных сперматозоидов в альгинатных микросферах является перспективным методом ВРТ, требующим дальнейшей разработки и оптимизации.

For today there have been developed effective cryopreservation technologies for human spermatozoa allowing the preservation of their viability and functional activity for a long time. Traditional approaches are focused to cryopreservation of suspensions with relatively high content of sperm cells ( $10^3$ – $10^8$ ), when moderate losses in cell amount are admissible. However, there is a need in cryopreserving single morphologically selected spermatozoa, preservation of sperm obtained by testicular biopsy, severe oligospermia, etc. In such cases, the loss of sperm cells during cryopreservation is not admissible and can dramatically affect the outcome of ART cycles. Therefore, for single spermatozoa cryopreservation a special microcarriers should be used. This facilitates the detection of single spermatozoa after thawing and virtually eliminates their quantitative losses. One of the promising containers for spermatozoa are alginate microbeads. Alginate microbeads are widely used in biotechnology and tissue engineering. The cells in alginate microbeads could be cryopreserved under the protection of penetrating cryoprotectants. In addition, the spermatozoa can be easily derived from alginate microspheres by depolymerization in the presence of chelating agents, that is an advantage comparing to others carriers, this would simplify the ICSI (intracyto-plasmic sperm injection) performance. We studied the possibility of cryopreservation of human spermatozoa in the alginate microbeads by freezing in liquid nitrogen vapors.

Motile spermatozoa from 5 donors were placed into alginate microbeads using a micromanipulator. Microbeads with spermatozoa were cryopreserved under glycerol protection in liquid nitrogen vapors. To release spermatozoa the alginate microbeads were subjected to depolymerization. Viability of spermatozoa after freezing in alginate microbeads and thawing was evaluated using a combination of fluorescent staining and hypoosmotic test.

It has been shown that after thawing the alginate microbeads kept structural integrity, and encapsulated spermatozoa were viable. Thus, the cryopreservation of single spermatozoa in alginate microbeads is a promising tool for ART, demanding further development and optimization.