

УДК 611.013.11:615.014.41:547.857.4

UDC 611.013.11:615.014.41:547.857.4

Динамика накопления лактата в спермиях человека при введении перфторана в среду гипотермического хранения

И.В. Черкашина

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Dynamics of Lactate Accumulation in Human Spermatozoa during Perftoran Introduction into Hypothermic Storage Medium

CHERKASHINA I.V.

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

Исследовано влияние газотранспортного кровезаменителя "Перфторан" на содержание молочной кислоты и подвижность спермиев в условиях гипотермического хранения при 4°C. Показано, что добавление перфторана (ПФ) в среду инкубации в сочетании с действием производных метилксантина на этапе полной остановки клеток позволяет продлить время хранения спермиев до 120 ч. Изменение содержания лактата в среде инкубации с ПФ свидетельствует о возможности спермиев человека переходить на аэробный метаболизм после 72-х часов хранения при гипотермии.

Ключевые слова: спермии, перфторан, гипотермия, лактат, подвижность.

Досліджено вплив газотранспортного кровезамінювача "Перфторан" на вміст молочної кислоти і рухливість спермій в умовах гіпотермічного зберігання при 4°C. Показано, що додавання перфторану в середовище інкубації у сполученні з дією похідних метилксантину на етапі повної зупинки клітин, дозволяє продовжити час зберігання спермій до 120 год. Зміна вмісту лактата в середовищі інкубації з ПФ переконливо свідчить про можливість спермій людини переходити на аеробний метаболізм після 72-х годин зберігання при гіпотермії.

Ключові слова: спермії, перфторан, гіпотермія, лактат, рухливість.

There was studied the effect of a gas-transporting blood-substitute Perftoran on lactic acid content and spermatozoa motility under hypothermic storage conditions at 4°C. It has been demonstrated that perftoran (PF) adding into the incubation medium combined with the effect of methylxantine derivatives at the stage of complete stopping of cells gives the possibility to prolong the storage time of spermatozoa up to 120hrs. The change of lactate content in incubation medium with PF testifies to the possibility of human spermatozoa to change for aerobic metabolism following 72hrs' hypothermic storage.

Key-words: spermatozoa, perftoran, hypothermy, lactate, motility.

Наряду с криоконсервированной спермой в вспомогательных репродуктивных технологиях часто используют клетки, хранившиеся при гипотермии. Это связано с необходимостью повторной инсеминации спермой мужа, реинсеминации яйцеклеток или отсрочкой их инсеминации после созревания. Кроме того, использование гипотермии позволяет избежать криповреждения спермиев в процессе замораживания-отогрева и сохранить акросому клеток [2]. Основным технологическим приёмом при современных методах низкотемпературного хранения спермы является использование криозащитных сред, состав и свойства которых в основном определяют эффективность криоконсервирования. Многие из компонентов известных криозащитных сред являются фармакопейными препаратами. Существует ряд лекарственных средств, интерес к которым со временем не только не ослабевает, но

In reproductive technologies together with cryopreserved sperm we often use the cells stored under hypothermia. This is related to the necessity of repeated insemination with a husband's sperm after the maturation. In addition the use of hypothermia allows to avoid the cryodamages of spermatozoa during the freeze-thawing process and preserve a cell acrosome [2]. The use of cryoprotective media, the composition and properties of which determine in a major extent the cryopreservation efficacy, is the basic technological way in current methods of sperm low-temperature storage.

The majority of components of many cryoprotective media are known to be pharmacopeial preparations. There are the series of medicinal preparations, the interest to those is increasing with finding the new fields and opportunities for their application. To those preparations, which potential has not been completed up to the present time, a gas-transporting "Perftoran"

Адрес для корреспонденции: Черкашина И.В., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 7721119, факс: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Address for correspondence: Cherkashina I.V. Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +38 (057) 7721119, fax: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

и усиливается, открывая новые области и возможности их применения. К числу препаратов, потенциал которых до сих пор не исчерпан, относится газотранспортный перфторуглеродный кровезаменитель “Перфторан”, разработанный в 1979 г. Ф.Ф. Белоярцевым, И.Л. Кнунянцем и Г.Р. Иваницким (Россия, Пущино) [3, 5].

Целью данной работы являлось изучение влияния ПФ на подвижность спермиев человека и содержание молочной кислоты в эякуляте при гипотермическом хранении 4°C.

Материалы и методы

Материалом исследования служили эякуляты от доноров с нормоспермией (количество сперматозоидов – 20×10^6 /мл; подвижность – более 25 % подвижных спермиев через 60 мин после эякуляции; морфология – более 50% нормальной формы; агглютинации нет; объём эякулята – более 2 мл; вязкость спермы нормальная; pH 7,2-7,8; лейкоциты – менее $1,0 \times 10^6$ /мл). Исследовали подвижность с помощью микроскопа. Качество спермы до и после гипотермического хранения определяли путём анализа характера движения 100 клеток в каждой пробе и выражали в процентах подвижных спермиев, движущихся прямолинейно поступательно. Концентрацию молочной кислоты определяли ферментативным методом по накоплению никотинамидадениндинуклеотида восстановленного (НАДН) в системе сопряжённых ферментативных реакций [1]. Для измерений использовали безбелковый экстракт спермиев. Для получения экстракта к 0,25 мл эякулята добавляли 0,5 мл 6 %-й HClO_4 при 0°C, через 5 мин центрифугировали при 1500g 10 мин. К 0,1 мл супернатанта добавляли 1 мл 0,5 моль/л глицин-гидразинового буфера (pH 9), 0,02 мл раствора лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и 0,1 мл 0,027 моль/л раствора никотинамидадениндинуклеотида и инкубировали при 25°C в течение часа. Оптическую плотность измеряли спектрофотометром Shimadzu QV-50 (Япония) при длине волны 340 нм. Содержание молочной кислоты выражали в ммоль/л.

Результаты и обсуждение

Ранее нами было показано [4], что целесообразно вводить в среду хранения спермиев человека ПФ в концентрации 40 об. %. Проводили 2 серии экспериментов. В 1-й серии изучали влияние ПФ на подвижность спермиев после гипотермического хранения в растворе Хенкса. Наблюдение за характером и продолжительностью движения клеток позволило установить, что переживаемость клеток в контроле увеличилась до 48 ч. Если среда содержала ПФ, спермии сохраняли подвижность в течение 72 ч. Последующее внесение в среду

blood substitute, elaborated in 1979 by Beloyartsev F.F., Knunyantsev I.L. and Ivanitsky G.R. (Russia, Puschino), may also be referred [3, 5].

Studying of the PF effect on human spermatozoa motility and lactic acid content in ejaculate at hypothermic storage under 4°C was the aim of the work.

Materials and methods.

Ejaculates procured from donors with normospermia (spermatozoa amount made 20×10^6 /ml); motility was more than 25% of motile spermatozoa in 60 min after ejaculation; with morphology of more than 50% of normal shape; no agglutination; ejaculate volume made more than 2 ml, normal sperm viscosity; pH 7.2-7.8, leukocytes amount made less than 1.0×10^6 /ml). The motility was investigated using microscope. Sperm quality prior to and following hypothermic storage was determined by the analysis of movement character of 100 cells in each sample and manifested in the percentage of motile spermatozoa, moving progressively and forwardly. Lactic acid concentration was evaluated by enzymic method on accumulation of nicotinamide adenine dinucleotide reduced (NADH) in the system of bound enzymic reactions [1]. Protein-free spermatozoa extract was used for the evaluations. To obtain the extract to 0.25ml of ejaculate were added 0.5ml 6% HClO_4 under 0°C, in 5 min centrifuged at 1500g within 10 min. To 0.1 ml of supernatant there was added 1 ml of 0.5mol/l glycerol-hydrazine buffer (pH 9), 0.02 ml of LDH solution and 0.1 ml of 0.027 mol/l of nicotinamide adenine dinucleotide solution and incubated under 25°C within an hour. Optic density was measured using Shimadzu QV-50 spectrophotometer (Japan) at a wave length of 340 nm. Lactic acid content was expressed in mmol/l.

Results and discussion

We demonstrated previously [4] that it was reasonable to introduce PF in 40 % (v/v) concentration into a storage medium of human spermatozoa. We performed 2 sessions of experiments. In the 1st series of experiments there was studied the PF effect on spermatozoa motility following hypothermic storage in Hanks' medium. Observation of the character and duration of cell motility allowed to establish the fact that cell viability in the control increased up to 48 hrs. Spermatozoa kept their motility within 72 hrs if the medium comprises PF. The following introduction into the medium of pentoxiphyllin motility stimulator under final concentration of 3.5 mmol/l [6] did not result in cell activation in the control. In PF-containing suspension there was observed the motility increase up to the initial level. A complete stopping of spermatozoa was observed only after 120hrs of incubation (Figure).

стимулятора подвижности пентоксифиллина в конечной концентрации 3,5 ммоль/л [6] не привело к активации клеток в контроле. В суспензии, содержащей ПФ, наблюдалось увеличение подвижности до исходного уровня. Полная остановка спермиев была зафиксирована только после 120 ч инкубации (рисунок).

Следует отметить, что по данным [7, 8] сперма человека *in vitro* при комнатной температуре может сохранять свою подвижность 12-24 ч, а при гипотермическом хранении – 48 ч.

Во 2-й серии экспериментов нами было показано, что концентрация молочной кислоты убывала после 48 ч инкубации и нарастала после 72-х часов в обеих исследуемых группах (таблица).

В то же время при хранении клеток в среде с ПФ уровень лактата был выше чем в контроле вне временного интервала (48-72 ч). Минимальное содержание молочной кислоты в наших экспериментах совпадало с полной остановкой клеток в контроле и значительным снижением подвижности спермиев в образцах, содержащих ПФ. В этом состоянии спермии стимулировали пентоксифиллином в контроле и опыте. В контрольной суспензии динамика накопления лактата не изменилась и подвижных клеток не наблюдалось, в среде с ПФ отмечались повышение уровня молочной кислоты

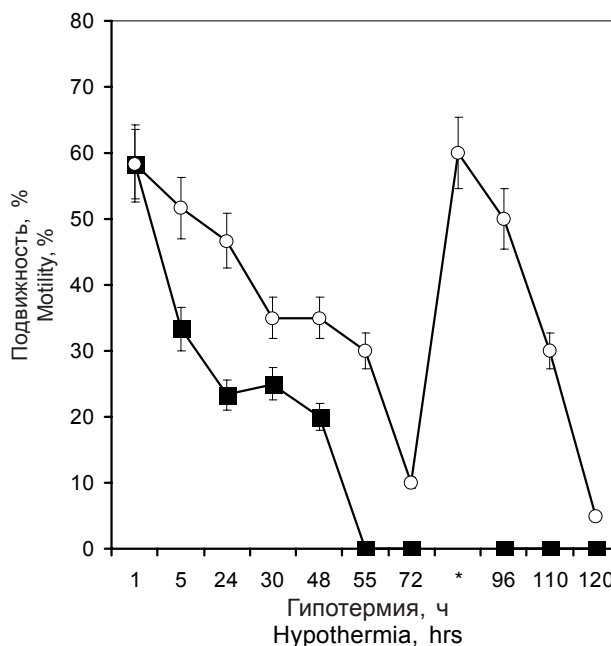
Концентрация молочной кислоты (мм) в сперме после различных сроков хранения в среде, содержащей ПФ ($X \pm x$), n = 12

Lactic acid concentration (mM) in sperm after various storage terms in the medium containing PF ($X \pm x$), n = 12

Длительность хранения спермиев при 4°C, ч Duration of spermatozoa storage at 4°C, hrs	Концентрация молочной кислоты, мм Lactic acid concentration, mM	
	Контроль Control	ПФ PF
0	0,88 ± 0,08	0,88 ± 0,08
5	0,91 ± 0,15	1,24 ± 0,09*
24	0,91 ± 0,13	1,17 ± 0,1*
36	1,13 ± 0,12	1,19 ± 0,11
48	1,35 ± 0,23	1,2 ± 0,31
55	0,89 ± 0,34	0,78 ± 0,25
72	1,0 ± 0,16	1,22 ± 0,20
96	1,14 ± 0,25	1,44 ± 0,27
110	1,1 ± 0,17	1,5 ± 0,10*
120	1,06 ± 0,21	1,72 ± 0,24

Примечание: * – достоверность различий между контролем и опытом ($P < 0.05$).

Notes: * – significant differences between the control and experimental groups ($P < 0.05$).



Влияние ПФ на подвижность спермиев человека после гипотермического хранения в среде Хенкса; * – стимуляция пентоксифиллином в контроле и опыте; ■ – контроль; ○ – ПФ.

PF effect on human spermatozoa ability following hypothermic storage in Hanks' medium; * – stimulation with pentoxifyllin in the control and experiment; ■ – control; ○ – PF.

It should be noted that according to the data [7, 8] human sperm *in vitro* under room temperature is capable to keep its motility within 12-24hrs, and under hypothermic storage this time makes 48 hrs.

In the 2nd session of experiments we have shown that lactic acid concentration decreased in 48 hrs of incubation and augmented following 72 hrs in the both studied groups (the Table).

At the same time during cell storage in the medium with PH lactate level was higher than in the control beyond time interval (48-72hrs). The minimum lactic acid content in our experiments coincided with a complete stopping of cells in the control and considerable reduction of spermatozoa motility in the samples comprised PF. Under this state spermatozoa were stimulated by pentoxifyllin in the control and experiment. In the control suspension the dynamics of lactate accumulation did not change and no motile cells were observed, in the medium with PF there was noted an increase of lactic acid level and motility recovery up to the level equal to the initial one before the incubation start.

Under anaerobic conditions the lactate formed as a final glycolysis product is known to be utilized completely only at a sufficient oxygen content in a medium [8]. The presence of intercellular and intracellular lactate shuttles [10] allows us to suppose that glycolysis and respiration are bound to each other as two alternative processes, as lactate, being the

и восстановление подвижности спермиев до уровня, соответствующего исходному до начала инкубации.

Известно [8], что при анаэробных условиях лактат, образовавшийся как конечный продукт гликолиза, полностью утилизируется только при достаточном содержании кислорода в среде. Наличие межклеточных и внутриклеточных челноков лактата [10] дает основание полагать, что гликолиз и дыхание связаны между собой как 2 альтернативных процесса, так как лактат, являясь продуктом одного из них, служит субстратом для другого. Впервые гипотезу о локализации ЛДГ в митохондриях высказали Baba и Sharma [9]. Используя электронную микроскопию и гистохимические исследования, они нашли, что ЛДГ связана с внутренней мембраной митохондрий. Присутствие внутриклеточного лактатного шунта в спермиях человека было впервые доказано Hochachka [11], который обнаружил изоформу ЛДГ-C4 в митохондриях этих клеток. Автор полностью описал физиологический и эволюционный аспект окисления лактата митохондриями спермиев. Образующийся в результате фруктолиза пируват ингибирует поглощение кислорода клетками, которое в свою очередь поддерживается лактатом из-за реокисления НАДН пируватдегидрогеназой [12].

Выводы

Мы полагаем, что во временном интервале 48-72 ч, под воздействием ПФ спермии человека, полностью утилизировав фруктозу семенной плазмы, переходят на аэробный путь обмена и начинают активно метаболизировать кислород. Полученные нами экспериментальные данные показывают, что спермии человека могут являться факультативными анаэробами, способными при определённых условиях использовать кислород для обеспечения подвижности. Добавление пентоксифиллина позволяет более чётко увидеть эту тенденцию.

Литература

1. *Асатиани В.С.* Ферментные методы анализа.– М.: Наука, 1969.– С.293-298.
2. *Белоус А.М., Грищенко В.И.* Кробиология.– Киев: Наук. думка, 1994.– 430 с.
3. *Белоярцев Ф.Ф.* Медико-биологические аспекты применения эмульсий перфторуглеродов.– Пушино, 1983.– 186 с.
4. *Грищенко В.И., Черкашина И.В., Кучков И.Н., и др.* Влияние перфторана на подвижность и переживаемость спермиев человека при гипотермии // Пробл. кробиологии.– 2001.– № 4.– С. 8-11.
5. *Иваницкий Г.Р., Мороз В.В.* Перфторорганические соединения в биологии и медицине.– Пушино, 1999.– 286 с.

product of the one of those, serves as a substrate for another one. For the first time the hypothesis on lactate dehydrogenase (LDG) localization was reported by Baba and Sharma [9]. Using electron microscopy and histochemical investigations they have found that LDG is bound with inner mitochondria membrane. The presence of intracellular lactate shunt/bypass in human spermatozoa was firstly proved by Hochachka [11], who had found the LDG-C4 isoform in mitochondria of these cells. The author had completely described the physiological and evolution aspect of lactate oxidation by spermatozoa mitochondria. Pyruvate formed as a result of fructolysis is known to inhibit oxygen adsorption by cells, which in its turn is maintained by lactate due to NADH re-oxidation by pyruvate dehydrogenase [12].

Conclusions

We suppose that in a time interval of 48-72 hrs under PF effect human spermatozoa having utilized completely the seminal plasm fructose, change for an aerobic metabolism way and start active metabolism of oxygen. Obtained by us experimental data demonstrate that human spermatozoa may serve as facultative anaerobes under certain conditions capable of using oxygen to provide motility. Pentoxifyllin adding gives the possibility to trace this tendency more distinctly.

References

1. *Asatiani V.S.* Enzyme analysis methods.– Moscow: Nauka, 1969.– P. 293-298.
2. *Belous A.M., Grischenko V.I.* Cryobiology.– Kiev: Naukova dumka, 1994.– 430p.
3. *Beloyartsev F.F.* Medical and biological aspects of the application of perfluorohydrogens.– Puschino, 1983.– 186 p.
4. *Grischenko V.I., Cherkashina I.V., Kuchkov I.N. et al.* Perftoran effect on the motility and viability of human spermatozoa under hypothermia // Problems of Cryobiology.– 2001.– N4.– P. 8-11.
5. *Ivanitsky G.R., Moroz V.V.* Perftoran organic compounds in biology and medicine.– Puschino, 1999.– 286 p.
6. *Kuchkov I.N.* Functional and biochemical properties of human spermatozoa during cryopreservation under the conditions of overcooling: Abstract of authors thesis of candidate's degree obtaining (biology), Kharkov, 2000.– 17 p.
7. *Molnar E.* General spermatology.– Budapest: Hungary, 1969.– 294 p.
8. *Porudominsky I.M.* Sexual disorders in men.– Moscow: Medgiz, 1960.– 279 p.
9. *Baba N., Sharma H.M.* Histochemistry of lactic dehydrogenase in heart and pectoralis muscles of rat // Cell biol.– Vol.51.– 1971.– P. 621-635.
10. *Brooks G. A.* Lactate shuttles in Nature // Biochemical Society Transactions.– 2002.– Vol.30.– P. 258-264.
11. *Hochachka P.W.* Living without oxygen. Cambridge: Harvard University Press, 1980.– 200 p.
12. *Storey B.T., Kayne F.J.* Energy metabolism of spermatozoa VII: interactions between lactate, pyruvate and malate as oxidative substrates for rabbit sperm mitochondria // Biol. Reprod.– 1978.– Vol.18.– P. 527.

Accepted in 22.04.2003

6. Кучков И.Н. Функциональные и биохимические свойства спермиев человека при криоконсервации в условиях сверхбыстрого охлаждения: Автореф. дис...канд. биол. наук.– Харьков, 2000.– 17 с.
7. Молнар Е. Общая сперматология.– Будапешт: Изд-во Венгрии, 1969.– 294 с.
8. Порудоминский И.М. Половые расстройства у мужчин.– М.: Медгиз, 1960.– 279 с.
9. Baba N., Sharma H.M. Histochemistry of lactic dehydrogenase in heart and pectoralis muscles of rat // Cell biol.– Vol.51.– 1971.– P. 621-635.
10. Brooks G. A. Lactate shuttles in Nature // Biochemical Society Transactions.– 2002.– Vol. 30.– P. 258-264.
11. Hochachka P.W. Living without oxygen. Cambridge: Harvard University Press, 1980.- 200 p.
12. Storey B.T., Kayne F.J. Energy metabolism of spermatozoa VII: interactions between lactate, pyruvate and malate as oxidative substrates for rabbit sperm mitochondria // Biol. Reprod.– 1978.– Vol.18.– P. 527.

Поступила 22.04.2003