

## Влияние адреналина на подвижность спермиев человека на этапах низкотемпературного консервирования

UDC 615.832.9:577.175.522:612.616

V.L. RODIONOVA<sup>1\*</sup>, N.N. CHUB<sup>1</sup>, T.YU. SCHEGOLEVA<sup>2</sup>

## Effect of Epinephrine on Human Spermatozoa Motility at Low Temperature Preservation Stages

В настоящее время для лечения мужского и женского бесплодия широко используются вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ), в частности низкотемпературное консервирование (НТК) спермы мужа или донора. Известно, что обеспечение условий для восстановления функциональных свойств спермиев после НТК не менее важно, чем этап замораживания. Для улучшения фертильности криоконсервированной спермы ранее использовали физические факторы (ультразвук, лучи лазера, постоянное магнитное поле), биологически активные жидкости (фолликулярная жидкость, сыворотка крови), фармакологические препараты (простагландин, пентоксифиллин, прогестерон, кофеин). Однако необходим поиск новых условий и средств для восстановления спермиев после НТК. Известно, что адреналин, как ацетилхолин и другие вазоконстрикторы, контролирует транспортировку спермиев в женском репродуктивном тракте и влияет на физиологические процессы в организме и клетке [1].

Цель работы – изучение влияния адреналина на подвижность спермиев человека на этапах низкотемпературного криоконсервирования.

### Материалы и методы

Материалом исследования были эякуляты, полученные у 47 мужчин с нормозооспермией в возрасте от 20 до 40 лет после 3–4-дневной половой абстиненции. Концентрацию и подвижность спермиев оценивали согласно [5] в камере Makler (Израиль) на световом микроскопе PZO (Польша) при  $\times 240$ . Спермии с быстрым и медленным поступательным прямолинейным движением относили к группе “a+b”, т.е. к активноподвижным и подвижным. После добавления (1:1) к эякуляту криозащитной среды – глицерин-лактоза-желток (ГЛЖ) –

Now the assisted reproductive techniques (ART), in particular, low temperature preservation (LTP) of husband's or donor's sperm, are used widely for treatment of male and female sterility. It has been known that the conditions creating for recovery of functional properties of spermatozoa after LTP is equally important than freezing stage. Previously, the physical factors (ultrasound, laser rays, constant magnetic field), biologically active fluids (follicular fluid, blood serum), pharmacological preparations (prostaglandin, caffeine, pentoxifylline, progesteron) for fertility improvement of cryopreserved sperm have been used. However the research of new conditions and facilities for recovering of spermatozoa after LTP is necessary. It has been known that epinephrine as acetylcholine and other vasoconstrictors controls the spermatozoa transport in female reproductive tract and affects physiological processes in an organism and a cell [1].

The research aim was to study the effect of epinephrine on human spermatozoa motility at stages of low temperature preservation.

### Materials and methods

The ejaculates obtained from 47 men with normozoospermia aged 20–40 years after 3–4 days of sexual abstinence were investigation material. Concentration and motility of spermatozoa were evaluated according to [5] in Makler chamber by means of light microscope PZO (Poland) at  $\times 240$ . Spermatozoa with rapid and slow progressive forward movement were referred to “a+b” group, i.e. to active-motile and motile. After adding glycerol-lactose-yolk (GLY) cryoprotective medium (1:1) to ejaculate, the samples were packed into 0.5–0.7 ml plastic tubes, sealed and cryopreserved [3]. Ejaculates were washed out of sperm plasma and cryoprotective medium in Hanks solution (HS) and the medium, containing HS and epinephrine (“Zdorovyie”,

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

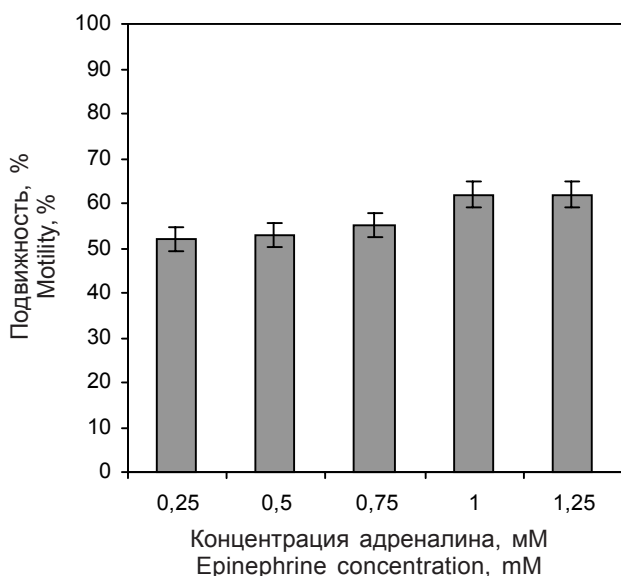
<sup>2</sup>Институт радиопизики и электроники им. А.Я. Усикова, г. Харьков

\* 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

<sup>1</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

<sup>2</sup>Usikov Institute of Radiophysics and Electronics, 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



**Рис. 1.** Зависимость подвижности спермиев от концентрации адреналина в среде инкубации.

**Fig. 1.** Dependence of spermatozoa motility from epinephrine concentration in incubation media.

образцы спермы расфасовывали по 0,5–0,7 мл в полиэтиленовые трубочки, герметизировали и криоконсервировали [3]. Эякуляты отмывали от спермальной плазмы и криозащитной среды в растворе Хэнкса (РХ) и наслаивали среду, содержащую РХ и адреналин (ФК “Здоровье”, Украина). Переживаемость спермиев оценивали через 30, 60 и 120 мин. Статистическую обработку проводили по критерию Стьюдента-Фишера.

### Результаты и обсуждение

При оценке нативных эякулятов концентрация спермиев в 1 мл составляла  $78 \pm 6,8$  млн, при добавлении ГЛЖ –  $45 \pm 4,0$  млн/мл, после размораживания –  $40 \pm 3,8$  млн/мл.

На первом этапе исследований с целью подбора оптимальной дозы адреналина для стимуляции подвижности применяли следующие концентрации: 0,25; 0,5; 0,75; 1 и 1,25 мМ. Наиболее высокие показатели подвижности спермиев были получены при концентрации 1 мМ,  $p < 0,5$  (рис. 1).

При использовании данной дозы адреналина в дальнейших экспериментах достоверные различия подвижности спермиев в образцах до криоконсервирования не установлены (рис. 2).

Однако после НТК концентрация мужских гамет в группе “а+в” была достоверно выше концентрации образцов, находившихся в среде без адреналина, при этом основную фракцию составили активно-подвижные спермии ( $p < 0,5$ ).

На клеточном уровне адреналин воздействует на  $\beta$ -адренорецепторы, большое количество которых расположено на хвосте спермия [1, 4]. При этом происходит активация аденилатциклазы, что

Ukraine) was layered. Spermatozoa’s survival was estimated for 30, 60 and 120 min. Statistical processing was carried out by the Student-Fisher’s criterion.

### Results and discussion

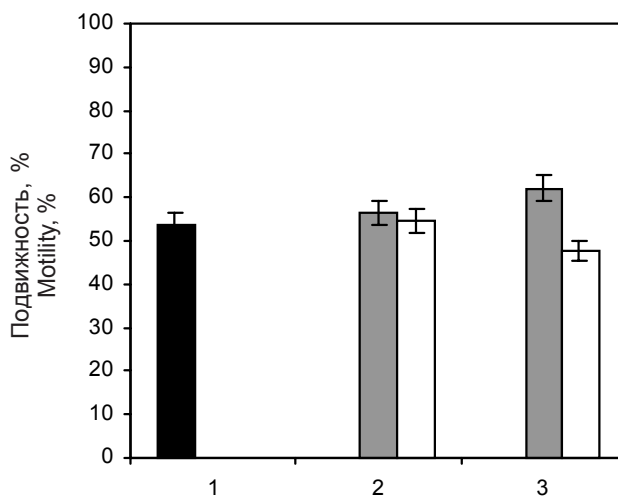
In estimating of native ejaculates the spermatozoa concentration in 1 ml made  $78 \pm 6.8$  mln,  $45 \pm 4.0$  mln/ml for adding glycerol-lactose-yolk,  $40 \pm 3,8$  mln/ml after freeze-thawing.

In first experiment we used following concentration: 0.25; 0.5; 0.75; 1 and 1.25 mM for selection of optimal epinephrine dose for stimulation of sperm motility. As shown in Figure 1, the best indices of sperm motility were received when using the concentration of 1 mM,  $p < 0.5$ .

In further research when using this dose of epinephrine there were not discovered significant differences in sperm motility in the samples before cryopreservation (Fig. 2).

However after LTP the male gametes’ concentration in “a+b” group was significantly higher, than the one for the samples, which were in media without epinephrine, herewith the active-motile spermatozoa formed the basic fraction ( $p < 0.5$ ).

At the cellular level the epinephrine has an effect on  $\beta$ -adrenoreceptors, a great number of which is located on spermatozoon tail [1, 4]. At this the activation of adenylate cyclase is present that results in the increase of intracellular cAMP formation, a “secondary” transmitter. Cyclic AMP stimulates the macroergic compound biosyntheses, in particular, ATP, by



**Рис. 2.** Влияние адреналина на подвижность спермиев человека (группа “а+в”) на этапах НТК: 1 – контроль (нативные образцы); 2 – образцы до криоконсервирования; 3 – образцы после криоконсервирования. ■ – натив; ■ – адреналин; □ – глицерин-лактоза-желток.

**Fig. 2.** Effect of epinephrine on motility of human spermatozoa (“a+b” group) at LTP stages: 1 – control (native samples); 2 – samples before cryopreservation; 3 – samples after cryopreservation. ■ – native; ■ – epinephrine; □ – glycerol-lactose-yolk.

увеличивает выработку внутриклеточного цАМФ – “вторичного” передатчика. Циклический АМФ стимулирует биосинтез макроэргических соединений, в частности АТФ, что вероятно увеличивает подвижность спермиев. Данный факт подтверждает результаты сравнительного изучения переживаемости спермиев. Достоверное снижение подвижности спермиев отмечено через 1 ч в среде с адреналином и через 2 ч – в среде с пентоксифиллином (рис. 3), что необходимо учитывать при подготовке образцов спермы для проведения ВРТ.

Повышение уровня цАМФ – наиболее ранний признак стресса клетки [2], поэтому биостимуляторы следует строго дозировать. Чрезмерная активация внутриклеточной системы в спермиях может привести к гиперстимуляции, преждевременной акросомальной реакции или гибели клеток. Механизм действия адреналина на спермии человека окончательно не изучен.

### Выводы

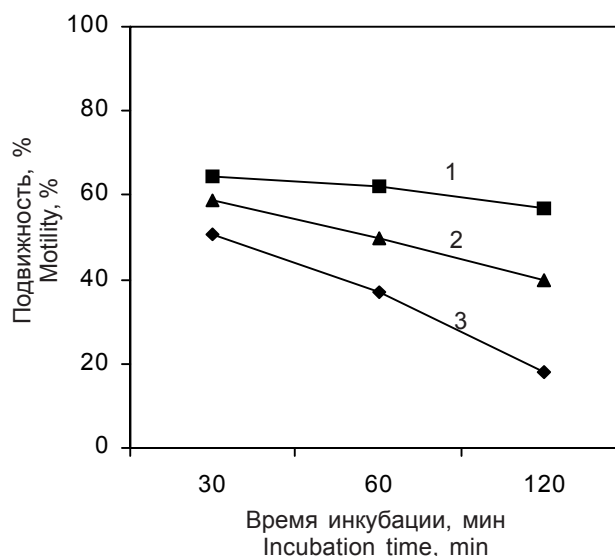
Определено оптимальное содержание адреналина (1мМ) в среде инкубации для стимуляции мотильности спермиев до и после НТК.

Использование адреналина для восстановления криоконсервированных спермиев человека позволяет достоверно повысить содержание активно-подвижных и подвижных спермиев.

### Литература

1. *Машковский М.Д.* Лекарственные средства.– Харьков, 1997.– Т. 1.– 560 с.
2. *Меерсон Ф.З.* Патогенез и предупреждение стрессовых и ишемических повреждение сердца.– М.: Медицина, 1984.– 52 с.
3. *Пат. №70803А (Україна) МПК А01N1/00.* Спосіб низькотемпературного консервування сперми донорів / В.І. Грищенко, Н.Н. Чуб, М.І. Крамар, В.Л. Родіонова. №20031212833; Заявлено 29.12.2003; Опубл. 15.10.2004. – Бюл. № 10. – С. 3.15.
4. *Delgado N. M., Sanchez-Vazquez M. L., Hernandez O. et al.* Correlation between sperm membrane destabilization by heparin and aniline blue staining as membrane integrity index // Arch. Androl.– 1998. – Vol. 96, N2.– P. 147–152.
5. *World Health Organization.* Laboratory manual for examination of human semen and semen-cervical mucus interaction.– Cambridge: The Press Syndicate of the University of Cambridge, 1997.– 22 p.

Поступила 20.05.2008



**Рис.3.** Время переживаемости спермиев в средах инкубации, содержащих адреналин и пентоксифиллин: 1 – пентоксифиллин; 2 – адреналин; 3 – PH.

**Fig. 3.** Spermatozoa survival time in incubation media, containing epinephrine and pentoxifylline: 1 – pentoxifylline; 2 – epinephrine; 3 – HS.

probably increasing the spermatozoa motility. This fact confirms to the results of comparative study of spermatozoa survival. Statistically significant decrease in spermatozoa motility was observed 1 hr after epinephrine adding and 2 hrs after pentoxifylline one (Fig. 3), that should be taken into consideration, when preparing the sperms samples for assisted reproductive techniques.

An increase in cAMP level is known to be the earliest sign of cell stress [2], due to that the biostimulators should be exactly dosed. An excessive activation of intracellular system in spermatozoa may result in hyperstimulation, premature acrosomal reaction or spermatozoa death. The mechanism of epinephrine effect on human spermatozoa has not been investigated completely.

### Conclusions

The optimal content of epinephrine (1mM) in incubation medium for stimulation of spermatozoa motility before and after LTP has been established.

The use of epinephrine for recovering of human cryopreserved spermatozoa enables to significantly increase a content of active-motile and motile spermatozoa.

### References

1. *Mashkovskiy M.D.* Medical preparations.– Kharkov, 1997.– Vol. 1.– 560 p.
2. *Meerson F.Z.* Pathogenesis and prophylaxis of stress and ischemic heart damages.– Moscow: Meditsina, 1984.– 52 p.
3. *Patent № 70803 A Ukraine, IPCA01N1/00.* Method of low temperature preservation of donor's sperm/ Grischenko V.I.,

- Chub N.N., Kramar M.I., Rodionova V.L. № 20031212833; Applied 29.12.2003; Publ. 15.10.2004.– Bull.N 10.– P. 3.15.
4. *Delgado N. M., Sanchez-Vazquez M. L., Hernandez O. et al.* Correlation between sperm membrane destabilization by heparin and aniline blue staining as membrane integrity index // Arch. Androl.– 1998. – Vol. 96, N2.– P. 147–152.
  5. *World Health Organization.* Laboratory manual for examination of human semen and semen-cervical mucus interaction.– Cambridge: The Press Syndicate of the University of Cambridge, 1997.– 22 p.

*Accepted in 20.05.2008*