

Активность акрозина в криоконсервированных спермиях человека

А.В. ДУНАЕВСКАЯ, Н.Н. ЧУБ, М.И. КРАМАР, В.Л. РОДИОНОВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Acrosin Activity in Cryopreserved Human Spermatozoa

DUNAYEVSKAYA A.V., CHUB N.N., KRAMAR M.I., RODIONOVA V.L.

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

Приведены результаты анализа влияния различных скоростей замораживания на морфологическую сохранность и ферментативную активность спермиев человека. Показано, что при замораживании по программе и со скоростью 2500°C/мин сохраняются активность акрозина и структурная целостность спермиев.

Ключевые слова: спермии человека, криоконсервирование, акросома, акрозин.

Наведено результати аналізу впливу різних швидкостей заморожування на морфологічну цілість і ферментативну активність сперміїв людини. Показано, що при заморожуванні за програмою і зі швидкістю 2500°C/хв зберігаються активність акрозину і структурна цілість сперміїв.

Ключові слова: спермії людини, криоконсервування, акросома, акрозін.

There have been presented the results of the analysis of various freezing rates effect on morphological integrity and enzymic activity of human spermatozoa. It has been shown that during freezing with the program and with the rate of 2500°C/min the acrosin activity and structural integrity of spermatozoa are kept.

Key words: human spermatozoa, cryopreservation, acrosome, acrosin.

В спермиях человека наиболее чувствительны к температурному воздействию акросомальная и митохондриальная структуры. В процессе криоконсервирования, по данным электронной микроскопии, при сохранении хорошей подвижности были найдены значительные повреждения акросом спермиев в виде набухания, разрыхления, разрывов и отслаивания акросомальных мембран [7]. Подвижность спермиев и морфологическая оценка гамет, в частности акросом, не дают полного представления о фертильности спермиев. Акросома спермиев человека имеет большое значение в оплодотворении как *in vivo*, так и *in vitro*, повреждение данного участка клеток часто влечет за собой выход акросомальных ферментов. Основным ферментом в спермиях человека является акрозин – уникальная нейтральная протеиназа. Он располагается в акросомальной области головки спермиев на внутренней мембране в форме неактивного фермента (проакрозина), который при высвобождении из акросомы превращается в акрозин [8]. Можно предположить, что общая активность акрозина в эякуляте зависит от количества в нем спермиев с интактными акросомами. Было показано, что активность акрозина высоко коррелирует с частотой оплодотворения [5].

Цель данного исследования – изучение влияния различных режимов замораживания на активность акрозина и морфологическую сохранность спермиев человека.

Acrosomal and mitochondrial structures in human spermatozoa are known to be the most sensitive to temperature effect. According to the electron microscopy data, significant damages of spermatozoa acrosomes such as swelling, loosening, ruptures and exfoliation of acrosomal membranes were noted during cryopreservation together with a high motility [7]. Sperm motility and morphological evaluation of gametes, in particular, acrosomes, do not present a complete notion about the spermatozoa fertility. An acrosome of human spermatozoa is of great importance during fertilisation both *in vitro* and *in vivo*, the damage in this part of cells often causes the release of acrosomal enzymes. Acrosin being a unique neutral proteinase is known to be the major enzyme in human sperm. It is located in acrosomal part of spermatozoa head on an internal membrane as a form of inactive enzyme (proacrosine), which during the release out of an acrosome turns into acrosin [8]. It may be supposed that total acrosin activity in ejaculate depends on the number of spermatozoa with intact acrosomes in it. It has been demonstrated that acrosin activity highly correlates with fertilisation rate [5].

The studying of the effect of various freezing regimens on an acrosin activity and morphological integrity of human spermatozoa was the aim of the work.

For the present study there have been used 46 ejaculates taken from males with normospermia in 3-4 days of continence. The samples were put into

Адрес для корреспонденции: Дунаевская А.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: Dunayevskaya A.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

Для исследования использовали 46 эякулятов, полученных у мужчин с нормоспермией после 3-4-дневного полового воздержания. Пробы собирали в стерильные чашки Петри. Образцы разжижались при 37°C в течение 40-60 мин. Морфологические повреждения оценивали в мазках, окрашенных эозин-нигрозин и с помощью акроскопического теста [11]. Оценку спермокинезисграммы проводили в камере Маклера (Израиль) с учетом рекомендаций ВОЗ [12].

Материалы и методы

Активность акрозина определяли по модифицированной нами методике [3]. При построении калибровочной кривой концентрация рабочего раствора казеина составляла 1,0; 0,75; 0,5 и 0,25 мг/мл. Раствор казеина (1мл) с определенной концентрацией инкубировали 5 мин при 37°C. Затем добавляли 1 мл буферного раствора pH 7,4 с тритоном X-100, снова инкубировали при 37°C в течение 15 мин. После этого добавляли 1 мл 10%-й трихлоруксусной кислоты и измеряли оптическую плотность.

Для определения активности акрозина в образцах 1 мл эякулята или суспензии спермиев после криоконсервирования центрифугировали при 400 g в течение 10 мин. Пипеткой убирали надосадок и к осадку добавляли 5 мл 0,14 М КСl. Повторно центрифугировали при 400 g в течение 10 мин. В полученный осадок добавляли 3 мл натрий-фосфатного буфера pH 7,4, с 0,5%-м тритоном X-100, тщательно ресуспендировали и определяли концентрацию спермиев. Для экстракции фермента пробирки с суспензией клеток оставляли на 3 ч при комнатной температуре и периодически встряхивали. После инкубации образцы центрифугировали при 400g в течение 10 мин. Активность акрозина определяли в надосадочной жидкости. В пробирку наливали 1 мл рабочего раствора казеина и нагревали при 37°C в течение 5-10 мин. Затем добавляли 1 мл акросомального экстракта и инкубировали 15 мин при 37°C. Для осаждения нерасщепленного казеина реакцию останавливали добавлением 1 мл 10%-й трихлоруксусной кислоты. После этого в контрольную пробирку вместо казеина добавляли 1 мл фосфатного буфера с pH 8,0. Оптическую плотность определяли на фотометре КФК-3. С помощью калибровочного графика по разности оптической плотности опытных и контрольных проб находили концентрацию нерасщепленного казеина. Активность фермента определяли по формуле:

$$A = \frac{C_o - C_x}{M \times T} \times 10^3,$$

где C_o - начальная концентрация казеина, мг/мл;

sterile Petri dishes, diluted afterwards at 37°C within 40-60 min. Morphological damages were evaluated in the smears stained with eosin-nigrosin, and by means of acrosopic test as well [11]. Spermakinesisgraphy evaluation was performed using Makler's chamber (Israel) with keeping the WHO recommendations [12].

Materials and methods

Acrosin activity was determined according to the modified by us method [3]. When building the calibrating curve the concentration of a base casein solution made 1.0; 0.75; 0.5 and 0.25 mg/ml. Casein solution (1ml) with the certain concentration was incubated during 5 min at 37°C. Afterwards 1 ml of a buffer solution (pH 7.4) was added with triton X-100, incubated again at 37°C within 15 min. Then 1ml of 10% trichloroacetic acid was added and optical density was measured.

To evaluate acrosin activity in the samples 1 ml of ejaculate or spermatozoa suspension were centrifuged following cryopreservation under 400g within 10 min. Supernatant was removed by pipette and 5 ml 0.14 M KCl were added to the sediment. Then the second centrifuging followed under 400g within 10 min. To the sediment obtained there were added 3 ml of sodium-phosphate buffer (pH 7.4) with 0.5% triton X-100, thoroughly re-suspended, and spermatozoa concentration was determined. To extract the enzyme the vials with cell suspension were maintained for 3 hrs under a room temperature with a periodic shaking. Following incubation the samples were centrifuged under 400 g within 10 min. Acrosin activity was evaluated in a supernatant liquid. Into the vial there was added 1 ml of a base casein solution and warmed at 37°C within 5-10 min. Afterwards 1 ml of acrosomal extract was added and incubated during 15 min at 37°C. To achieve sedimentation of non-cleaved casein the reaction was stopped by adding 1 ml of 10% trichloroacetic acid. Then into the control vial 1 ml of phosphate buffer with pH 8.0 was added instead of casein. Optical density was determined using KFK-3 photometer. By means of the calibrating figure by the difference of an optical density of experimental and control samples there was found the concentration of non-cleaved casein. The enzyme activity was evaluated with the formula:

$$A = \frac{C_o - C_x}{M \times T} \times 10^3,$$

Where C_o – initial casein concentration, mg/ml; C_x – concentration of non-cleaved casein by a calibrating figure; M – number of spermatozoa, ml/ml; T – time of incubation of acrosomal extract with casein solution, 15 min.

Cryoprotective medium, comprising glycerol, glucose, sodium citrate and chicken egg yolk (CEY)

C_x - концентрация нерасщепленного казеина по калибровочному графику; M - количество спермиев, млн/мл; T - время инкубации акросомального экстракта с раствором казеина, 15 мин.

Для криоконсервирования использовали криозащитную среду, содержащую глицерин, глюкозу, цитрат натрия и желток куриного яйца (ГЦЖ). Образцы помещали в различные контейнеры и замораживали до -196°C по программе [2] или прямым погружением контейнеров в жидкий азот [1]. Для получения разных скоростей замораживания при быстром охлаждении использовали 3 типа цилиндрических контейнеров различных размеров и изготовленных из разных материалов. При прямом погружении в жидкий азот контейнера с радиусом внешней поверхности $r_c=0,25$ см и радиусом внутренней поверхности $r_m=0,55r_c$ была достигнута скорость замораживания около $1000^{\circ}\text{C}/\text{мин}$; контейнера с $r_c=0,125$ см и $r_m=0,52r_c$ - скорость около $2500^{\circ}\text{C}/\text{мин}$; контейнера с $r_c=0,125$ см и $r_m=0,76r_c$ - скорость около $10000^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Скорость замораживания определяли эмпирически с помощью медь-константановой термопары, сигнал от которой подавался на осциллограф. Для размораживания контейнеры с образцами помещали в водяную баню при $37-40^{\circ}\text{C}$ до появления жидкой фазы. Статистическую обработку проводили с помощью программы Excel, используя критерий Стьюдента.

Результаты и обсуждение

В результате исследования было отмечено, что средние показатели нативных образцов эякулятов составили: количество спермиев в эякуляте - $78 \pm 6,3$ млн/мл, активно подвижные спермии (группа a+b) - 50%, спермии с целой акросомой - 64% ($P < 0,05$). Было установлено, что в некоторых мертвых спермиях акросома сохранялась. Количество этих клеток суммарно не превышало 10%, однако при этом вызывает сомнение способность этих гамет к акросомальной реакции и наличие в акросоме акрозина. Было показано [4], что оплодотворяющий потенциал эякулята резко снижался, если в нем менее 40% спермиев имели неповрежденную акросому. В наших исследованиях установлено, что при замораживании со скоростью $1000^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ количество спермиев с целой акросомой достоверно снижалось (45%) по сравнению с контролем (68%). Соответственно увеличивалось количество спермиев с разрушающейся (32%) и с разрушенной (23%) акросомами. При замораживании со скоростью около $2500^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ сохранность акросом составляла 58%, количество спермиев с разрушающейся и разрушенной акросомами после криоконсервирования - 33 и 9% соответственно. Такое уменьшение количества

were used for cryopreservation. The samples were placed into different containers and frozen down to -196°C either according to the program [2] or by direct immersion of the containers into liquid nitrogen [1]. To get different freezing rates with a rapid cooling we have used 3 types of cylindrical containers of various sizes and made of different materials. During a direct immersion into liquid nitrogen the containers with the outer surface radius $r_c=0.25$ cm and the inner surface one $r_m=0.55r_c$ there has been achieved the freezing rate of about $1000^{\circ}\text{C}/\text{min}$; the containers with $r_c=0,125$ cm and $r_m=0.52r_c$ - achieved the rate of about $2500^{\circ}\text{C}/\text{min}$; the containers with $r_c=0,125$ and $r_m=0.76r_c$ - reached the rate of about $10000^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Freezing rate was evaluated empirically using copper-constantan thermocouple, the signal of which was sent to the oscillographer. To thaw the containers were put on water bath at $37-40^{\circ}\text{C}$ up to the appearance of a liquid phase.

Statistical processing was accomplished by the Excel program using Student's criterion.

Results and discussion

As a result of investigation it was noted that the mean values of native samples in ejaculates made: the number of spermatozoa in ejaculate: 78 ± 6.3 ml/ml, actively motile spermatozoa (the a+b group) made 50%, spermatozoa with an undamaged acrosome made 64%, ($P < 0.05$). It was established that in some dead spermatozoa the acrosome had remained to be alive. The total number of such cells did not exceed 10%, however in this case the capability of these gametes to acrosomal reaction and the presence of acrosin in an acrosome was doubtful. It was shown [4] that fertilising potential of an ejaculate sharply decreased in the case, if there is less than 40% of spermatozoa in it had an undamaged acrosome. Our investigation has established that when freezing with the rate of $1000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ the number of spermatozoa with an undamaged acrosome significantly decreased (45%) comparing to the control (68%). As a result, the number of spermatozoa with the acrosomes being under damage (32%) and the damaged ones, increased. When freezing with the rate of about $2500^{\circ}\text{C}/\text{min}$ acrosomal integrity made 58%, spermatozoa number with the acrosomes being under damage and the damaged ones after cryopreservation made 33 and 9%, correspondingly. Such a decrease of spermatozoa number with an acrosome in the norm correlates with the reduction of a progressive sperm motility: the a+b group made 32%. During cryopreservation of the samples with the freezing rate of $10000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ the number of gametes with an undamaged acrosome decreased down to 15%. The best indices for an acrosome integrity in human spermatozoa were noted during programmable

Активність акрозина, мг/мин
Acrosin activity, mg/min

Сохранность акросом и активность акрозина, %
Integrity of acrosome and acrosin activity, %

спермограммы. При отсутствии акросомальных ферментов (например, при глобулозооспермии) [9] или при преждевременном выходе акросомальных ферментов вследствие спонтанной акросомальной реакции, когда не удается достигнуть оплодотворения в ходе стандартной процедуры оплодотворения *in vitro*, применение интрацитоплазматической инъекции спермия может помочь преодолеть акросомальную дисфункцию. Кроме того, на этапах хранения спермиев как при положительных, так и при отрицательных температурах происходит дезорганизация липофильных структур плазматической мембраны, что является одной из причин преждевременной потери акросомы. Активность акрозина связана с морфофункциональным состоянием спермиев. Следовательно, биохимические свойства спермиев зависят от глубины их структурных изменений.

Литература

1. Грищенко В.И., Дунаевская А.В., Калугин Ю.В. Влияние быстрых и сверхбыстрых скоростей замораживания на сохранность спермиев человека // Пробл. криобиологии.– 2000.– № 2.– С. 52-57.
2. Грищенко В.И., Чуб Н.Н., Крамар М.И. и др. Криоконсервирование спермы донора // Пробл. репродукции.– 2001.– № 2.– С. 71-73.
3. Милованов В.К., Кольцова Е., Шайдуллин И., Варнавская В. Химическая природа антиоксидантов и их действие при замораживании семени барана // Животноводство.– 1981.– № 9.– С. 45-46.
4. Chan P.J., Corselli J.U., Lacobson J.D. et al. Sperm stain analysis of human sperm acrosomes // Fertil. Steril.– 1999.– Vol.72.– P. 124-128.
5. De Jonge C.J., Tarchala S.M., Rawlins R.G. et al. Acrosin activity in human spermatozoa in relation to semen quality and *in vitro* fertilization // Hum. Reprod.– 1993.– Vol. 8.– P. 253-257.
6. James P.S., Wolfe C.A., Mackie A. et al. Lipid dynamics in the plasma membrane of fresh and cryopreserved human spermatozoa // Hum. Reprod.– 1999.– Vol. 14.– P. 1827- 1832.
7. Mark S.R., Zaneveld L.J. Acrosomal enzymes and ultrastructure of unfrozen and cryotreated human spermatozoa // Gamete Res.– 1987.– Vol.18.– P. 375-383.
8. Menkveld R., Rhemrev J.P., Franken D.R. Acrosomal morphology as a novel criterion for male fertility diagnosis relation with acrosin activity, morphology (strict criteria), and fertilization *in vitro* // Fertil. Steril.– 1996.– Vol.65.– P. 637-644.
9. Syms A.J., Johnson A.R., Lipshultz L.I. et al. Studies on human spermatozoa with round head syndrome // Fertil. Steril.– 1984.– Vol. 42.– P. 431-435.
10. Tesarik J., Mendoza C. Alleviation of acrosome reaction prematurity by sperm treatment with egg yolk // Fertil. Steril.– 1995.– V. 63.– P. 153-157.
11. Tummon I.S., Yuzpe A.A., Daniel S.A.J., Deutsch A. Total acrosin activity correlates with fertility potential after fertilization *in vitro* // Fertil. Steril.– 1991.– Vol. 56.– P. 933-938.
12. 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.
13. Yanagimachi R. Mammalian fertilization // The Physiology of Reproduction. 2nd edn.– New York: Raven Press, 1994.– P. 189-317.

Поступила 18.06.2002

References

1. Grischenko V.I., Dunayevskaya A.V., Kalugin Yu.V. Action of rapid and suprarapid rates of freezing on survival of human spermatozoa // Problems of Cryobiology.– 2000.– N2.– P. 52-57.
2. Grischenko V.I., Chub N.N., Kramar M.J. et al. Donor's sperm cryopreservation// Problems of Reproduction.– 2001.– N2.– P. 71-73.
3. Milovanov V.K., Koltsova E., Shajdulin I., Varnavskaya V. Chemical nature of antioxidants and their effect when freezing ram sperm // Zhyvotnovodstvo.– 1981.– N9.– P. 45-46.
4. Chan P.J., Corselli J.U., Lacobson J.D. et al. Sperm stain analysis of human sperm acrosomes // Fertil. Steril.– 1999.– Vol.72.– P. 124-128.
5. De Jonge C.J., Tarchala S.M., Rawlins R.G. et al. Acrosin activity in human spermatozoa in relation to semen quality and *in vitro* fertilization // Hum. Reprod.– 1993.– Vol.8.– P. 253-257.
6. James P.S., Wolfe C.A., Mackie A. et al. Lipid dynamics in the plasma membrane of fresh and cryopreserved human spermatozoa // Hum. Reprod.– 1999.– Vol. 14.– P. 1827- 1832.
7. Mark S.R., Zaneveld L.J. Acrosomal enzymes and ultrastructure of unfrozen and cryotreated human spermatozoa // Gamete Res.– 1987.– Vol. 18.– P. 375-383.
8. Menkveld R., Rhemrev J.P., Franken D.R. Acrosomal morphology as a novel criterion for male fertility diagnosis relation with acrosin activity, morphology (strict criteria), and fertilization *in vitro* // Fertil. Steril.– 1996.– Vol.65.– P. 637-644.
9. Syms A.J., Johnson A.R., Lipshultz L.I. et al. Studies on human spermatozoa with round head syndrome // Fertil. Steril.– 1984. – Vol. 42.– P. 431-435.
10. Tesarik J., Mendoza C. Alleviation of acrosome reaction prematurity by sperm treatment with egg yolk // Fertil. Steril.– 1995.– V. 63.– P. 153-157.
11. Tummon I.S., Yuzpe A.A., Daniel S.A.J., Deutsch A. Total acrosin activity correlates with fertility potential after fertilization *in vitro* // Fertil. Steril.– 1991.– Vol.56.– P. 933-938.
12. 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.
13. Yanagimachi R. Mammalian fertilization // The Physiology of Reproduction. 2nd edn.– New York: Raven Press, 1994.– P. 189-317.

Accepted in 18.06.2002