

2. Jensen, R. G. 2002. Invited review: The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *J. Dairy Sci.*, 85: 295–350.
3. Grummer, R. R. 1991. Effect of feed on the composition of milk fat. *Dairy Sci.*, 74: 3244–3257.
4. Precht, D., and J. Molkenin. 1996. Rapid analysis of the trans-octadecenoic acid in milk fat. *Int. Dairy J.*, 6: 791–809.
5. Achman, R. G. 2000. The dichotomy of the trans-ethylenic bond in our foods. *Eur. J. Lipid Sci.*, 102: 630–632
6. Bauman, D. E., C. Tyburczy, A. M. O'Donnel, and A. L. Lock. 2007. Production and use of high foods in human health. *J. Dairy Sci.*, 90 (Suppl.1): 429.



УДК 636.2:612.621

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ ПОЛИМЕРИЗАЦИИ МИКРОФИЛАМЕНТОВ И ПРОТЕИНКИНАЗЫ А НА КАПАЦИТАЦИЮ СПЕРМАТОЗОИДОВ БЫКОВ, СТИМУЛИРОВАННУЮ ВЫСОКОДИСПЕРСНЫМ КРЕМНЕЗЕМОМ

Т. И. КУЗЬМИНА¹, Е. Н. БОЙЦЕВА¹, С. И. КОВТУН², Н. П. ГАЛАГАН³,
Е. С. УСЕНБЕКОВ⁴, В. Ю. ДЕНИСЕНКО¹

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных» (Санкт-Петербург – Пушкин, Российская Федерация)

²Институт разведения и генетики животных имени М.В.Зубца НААН (Чубинское, Украина)

³Институт химии поверхности им. А. А. Чуйка НАН Украины (Киев, Украина)

⁴Казахский национальный аграрный университет (Алматы, Республика Казахстан)
prof.kouzmina@mail.ru

Выявлено, что высокодисперсный кремнезем (ВДК) индуцирует капацитацию сперматозоидов быков. В механизм реализации его действия вовлечены микрофиламенты и протеинкиназа А, о чем свидетельствует снижение количества капацитированных клеток при обработке спермиев ингибитором полимеризации микрофиламентов цитохалазином Д и ингибитором протеинкиназы А Н-89.

Ключевые слова: сперматозоиды, капацитация, акросомная реакция, микрофиламенты, цитохалазин Д, протеинкиназа А, Н-89, внутриклеточное депо кальция

INFLUENCE OF INHIBITORS OF MICROFILAMENTS POLYMERIZATION AND PROTEIN KINASE A ON CAPACITATION OF BULL SPERM STIMULATED HIGHLY DISPERSIBLE SILICA

Т. И. Kuzmina¹, Е. N. Boytseva², S. I. Kovtun³, Н. P. Galagan⁴, Е. S. Usenbekov,
V. Yu. Denisenko

¹Federal State Budgetary Institution «All-Russian Research Institute of Genetics and breeding of farm animals» (St.-Petersburg-Pushkin, Russia)

²Institute of Animal Breeding and Genetics nd. a. M.V.Zubets NAAS (Chubynske, Ukraine)

© Т. И. Кузьмина, Е. Н. Бойцева, С. И. Ковтун,
Н. П. Галаган, Е. С. Усенбеков, В. Ю. Денисенко, 2015

³*Institute of Surface Chemistry nd. a. A.A.Chuyko (Kyiv, Ukraine)*

⁴*Kazakh National Agrarian University (Almaty, Kazakhstan)*

prof.kouzmina@mail.ru

It was revealed that the highly disperse silica (HDS) induces capacitation bull sperm. Microfilaments and protein kinase A are involved in the implementation of the mechanism of its action. Decrease the number of capacitated sperm after the treatment it by inhibitor of polymerization microfilament cytochalasin D and inhibitor of protein kinase A H-89 shows this.

Key words: sperm, capacitation, acrosome reaction, microfilaments, cytochalasin D, protein kinase A, H-89, intracellular stores of calcium

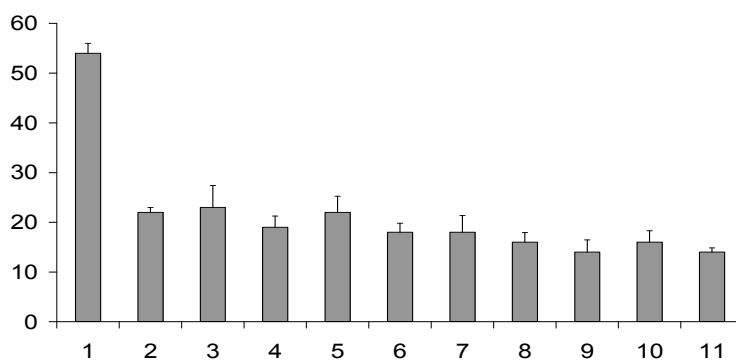
Методики криоконсервации мужских гамет до сих пор нуждаются в совершенствовании: процент клеток, погибающих в процессе этой процедуры, по-прежнему велик. На сегодняшний день существует множество вариантов сред для заморозки мужских гамет, различных криопротекторов, повышающих жизнеспособность сперматозоидов после криоконсервации. Одним из способов оптимизации криосред, как выяснили наши украинские коллеги [1, 7], является введение в них высокодисперсного кремнезема (ВДК). При добавлении ВДК к среде для криоконсервации сперматозоидов быков, после размораживания наблюдается повышение подвижности спермиев, увеличение показателей жизнеспособности клеток и стабилизация их мембран [1]. Механизмы реализации действия ВДК на замораживаемые мужские гаметы до конца не ясны.

Капацитация – сложный биохимический процесс, происходящий в сперматозоидах после эякуляции и необходимый для успешного оплодотворения. Она включает в себя: изменения в составе и текучести мембраны [2], увеличение концентрации цитоплазматического кальция [3], рост цитоплазматического pH [4], активацию ионных каналов [5] и образование активных форм кислорода [6]. Ключевую роль в индукции капацитации сперматозоидов быков играет кальциевая сигнализация [3, 9]. Настоящее исследование направлено на идентификацию путей перемещения кальция в спермиях быков при капацитации после обработки гамет высокодисперсным кремнеземом в концентрации 0,001 %. При выборе концентрации ВДК руководствовались данными, полученными ранее С. И. Ковтун и соавт. [7].

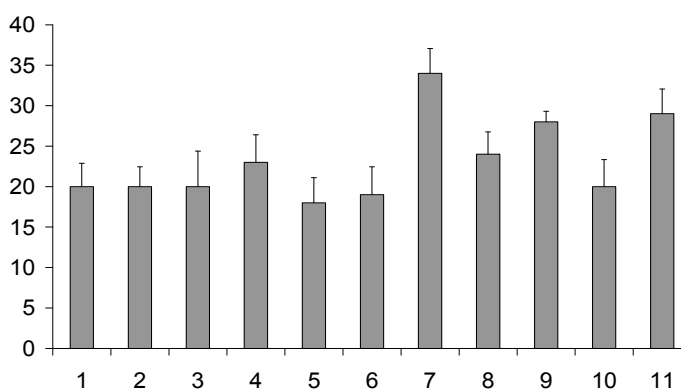
Материалы и методы исследований. Для работы использовалась свежая сперма, полученная за 15 минут до начала эксперимента от быков айрширской и голштинской пород. Эксперименты проводили с использованием термостоллика во избежание холодового шока сперматозоидов. Все реагенты, участвовавшие в работе, произведены фирмой Sigma. В экспериментах применяли высокодисперсный кремнезем А-300 (Украина, г. Калуш Ивано-Франковской обл.) с $S_{уд.} = 285 \text{ м}^2/\text{г}$ и предварительной обработкой поверхности при $T=200^{\circ}\text{C}$ в течение 2-ух часов. Спермии отмывали от семенной плазмы двукратным центрифугированием при $300 \times g$ в течение 10 минут в среде Sp-TALP, состоящей из: 100 mM NaCl, 3.1 mM KCl, 25 mM NaHCO₃, 0.3 mM NaH₂PO₄, 21.6 mM Lactate (sodium salt), 0.5 mM CaCl₂, 0.4 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 1 mM пирувата натрия и 0.1 % поливинилалкоголя (молекулярной массой 30000–70000 Да), pH = 7.4. Для инкубирования в среду Sp-TALP вместо поливинилалкоголя добавляли бычий сывороточный альбумин (БСА) в концентрации 6 мг/мл. Для капацитации сперматозоиды инкубировали в течение 4 часов при 38.5°C , 95 % влажности и 5 % CO₂. После инкубации из каждого экспериментального образца брали по 20 мкл суспензии и смешивали с 20 мкл свежеприготовленного раствора хлортетрациклина (ХТЦ) в концентрации 750 мкМ. Для окраски клеток раствор ХТЦ готовили на основе среды, содержащей 130 mM NaCl, 5 mM L-цистеина, 20 mM Трис (pH = 7.8). Спермии инкубировали с ХТЦ в течение 10 мин при 38.5°C , после чего к ним для фиксации добавляли 10 мкл 25 % глутеральдегида в 1мМ растворе Триса (pH=7.8) до конечной концентрации глутеральдегида 0.1 %. Данная концентрация фиксатора позволяет стабилизировать интенсивность флуоресценции в течение 2 часов, не оказывая при этом отрицательного влияния на клетки [7]. Далее 15 мкл суспензии смешивали с 15 мкл 0.22 М 1,4-дiazобизциклооктана,

растворенного в смеси глицерол/среда Дюльбекко (9:1, v/v). Затем при комнатной температуре 10 мкл суспензии сперматозоидов размещали на предметном стекле (делали по 2 капли каждого образца), накрывали покровным стеклом, закрепляя его с помощью бесцветного лака. Препараты наблюдали под микроскопом Zeiss AXIO Imager.A1 с фазовым контрастом и эпифлуоресцентной оптикой (возбуждение при 400-440 нм и излучение при 470 нм). В каждой группе клетки были классифицированы в соответствии с тремя типами окрашивания: с яркой флуоресценцией по всей головке спермия (некапцитированные, акросома-интактные сперматозоиды – «контрольные клетки»); свободная от флуоресценции полоса в постакросомальном районе (капцитированные, акросома-интактные клетки); слабая или отсутствующая флуоресценция всей головки сперматозоида, за исключением тонкой, яркой полосы в экваториальном сегменте (капцитированные, акросома-реактивные клетки). Достоверность различия сравниваемых средних значений для 4–5 независимых экспериментов оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента.

Результаты исследований. На рис. 1 отражены данные серии экспериментов, где было оценено участие микротрубочек, микрофиламентов, протеинкиназ А и С в стимулированной ВДК капцитации сперматозоидов быков, а также в акросомной реакции. Для этого использовали соответствующие ингибиторы: нокодазол, цитохалазин Д, Н-89 и Ro 31–8220. Было выявлено, что в контрольных (необработанных ВДК – столбец 2, 3, 4, 5, 6 на рис. 1.а,б,в) клетках воздействие ингибитора полимеризации микротрубочек нокодазола в концентрации 10 мкМ, ингибитора полимеризации микрофиламентов цитохалазина Д в концентрации 10 мкМ, а также ингибиторов протеинкиназ А и С – Н-89 и Ro 31–8220, в концентрации 10 и 5 мкМ, соответственно, не оказывает воздействия на количество капцитированных сперматозоидов, тогда как цитохалазин Д и Н-89 продемонстрировали явный ингибирующий эффект на стимулированную ВДК капцитацию сперматозоидов быков (рис. 1.б). При добавлении нокодазола и Ro 31–8220 такого действия не наблюдалось. При использовании нокодазола, цитохалазина Д и Н-89 наблюдалось увеличение доли клеток на стадии акросомной реакции в образцах, обработанных ВДК, тогда как Ro 31–8220 не оказал влияния на количество акросомареактивных сперматозоидов (рис. 1, в).



Контрольные клетки (а)



Капцитированные клетки (б)

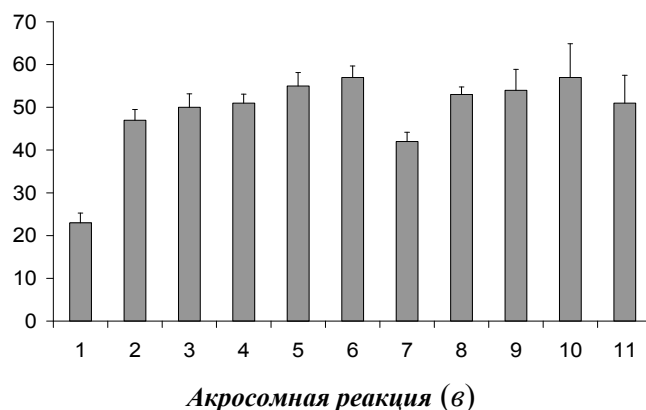


Рис. 1. Влияние ингибиторов полимеризации микрофиламентов и микротрубочек, протеинкиназы А и С на стимулированную высокодисперсным кремнеземом капацитацию сперматозоидов быков. По горизонтали – 1 – контроль на 0 часов; 2 – контроль через 4 часа инкубации; 3 – контроль совместно ингибитором полимеризации микрофиламентов цитохалазином Д (инкубация 4 часа); 4 – контроль совместно ингибитором полимеризации микротрубочек нокодазолом (инкубация 4 часа); 5 – контроль совместно ингибитором протеинкиназы А Н-89 (инкубация 4 часа); 6 – контроль совместно ингибитором протеинкиназы С Ro 31-8220 (инкубация 4 часа); 7 – действие ВДК в концентрации 0,001 %; 8 – совместное действие ВДК и цитохалазина Д; 9 – совместное действие ВДК и нокодазола; 10 – совместное действие ВДК и Н-89; 11 – совместное действие ВДК и Ro 31-8220. По вертикали – процентное содержание сперматозоидов. В каждом эксперименте оценивалось 800-1000 клеток каждого образца. Различия достоверны при: б - $P < 0.05$ (7 и 8), $P < 0.001$ (7 и 10), в - $P < 0.05$ (7 и 9), $P < 0.001$ (7 и 8).

Выводы. Наличие ингибирующего действия цитохалазина Д и Н-89 на капацитацию свидетельствует о том, что микрофиламенты и протеинкиназа А принимают непосредственное участие в стимуляции капацитации сперматозоидов быков после воздействия высокодисперсным кремнеземом. Данное заключение подтверждается отсутствием такого эффекта ингибиторов у необработанных высокодисперсным кремнеземом женских гамет. Причина, по которой при добавлении ингибиторов микрофиламентов, микротрубочек и протеинкиназы А возросла доля сперматозоидов на стадии акросомной реакции (а не контрольных клеток – некапацитированных, акросома-интактных сперматозоидов), не ясна. Можно предположить, что при блокировке путей индукции капацитации (микрофиламентов и протеинкиназы А) высокодисперсный кремнезем, с меньшим сродством, но все же взаимодействует с протеинкиназой С, которая, согласно нашей гипотезе, принимает участие в механизме акросомной реакции. Идентификация механизмов, детерминирующих стимулирующие эффекты высокодисперсного кремнезема на мужские гаметы, позволит интенсифицировать этапы технологии криоконсервации сперматозоидов.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Чуйко, А. А. Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния / А. А. Чуйко. – К., 2003. – 415 с.
2. Lin, Y Regionalization and redistribution of membrane phospholipids and cholesterol in mouse spermatozoa during in vitro capacitation / Y. Lin, F. W. Kan // Biol Reprod. – 1996. – No. 55. – P. 1133–1146.
3. Capacitation of mouse spermatozoa, I: correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation / P. E. Visconti, J. L. Bailey, G. D. Moore, D. Pan, P. Olds-Clarke, G. S. Kopf // Development. – 1995. – 121. – P. 1129–1137.
4. Vredenburg-Wilberg, W. L. Intracellular pH of bovine sperm increases during capacitation / W. L. Vredenburg-Wilberg, J. J. Parrish // Mol Reprod Dev. – 1995. – Vol. 40. P. 490–502.
5. Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation / P. E. Visconti, D. Krapf, J. L. de la Vega-Beltran, J. J. Acevedo, A. Darszon // Asian J Androl. – 2011. – V. 13. – P. 395–405.

6. Leclerc, P. Regulation of protein-tyrosine phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxygen derivatives / P. Leclerc, E. De Lamirande, C. Gagnon // *Free Radic Biol Med.* – 1997. – Vol. 22. – P. 43–56.
7. Ковтун, С. И. Тезисы научн. Конференции / С. И. Ковтун, Н. П. Галаган, Н. Ю. Клименко. – Максимовка, 2011. – С. 386–390.
8. Ward, C. R. Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay / C. R. Ward, B. T. Storey // *Dev Biol.* – 1984. – Vol. 104. – С. 287–296.
9. Денисенко, В. Ю. Идентификация путей трансдукции кальция в сперматозоидах *Bos Taurus* в зависимости от их функционального статуса / В. Ю. Денисенко, Е. Н. Бойцева, Т. И. Кузьмина // *Цитология.* – 2015. – Т. 3.

REFERENS

1. Chuyko, A. A. 2003. *Meditinskaya khimiya i klinicheskoe primeneniye dioksida kremniya – Medicinal chemistry and clinical application of silica.* Kiev, 415 (in Russian).
2. Lin, Y, F. W. Kan. 1996. Regionalization and redistribution of membrane phospholipids and cholesterol in mouse spermatozoa during in vitro capacitation. *Biol Reprod.* 55: 1133–1146.
3. Visconti, P. E, J. L. Bailey, G. D. Moore, D. Pan, P. Olds-Clarke, G. S. Kopf. 1995. Capacitation of mouse spermatozoa, I: correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development.* 121: 1129–37.
4. Vredenburg-Wilberg, W. L, J. J. Parrish. 1995. Intracellular pH of bovine sperm increases during capacitation. *Mol Reprod Dev.* 40: 490–502.
5. Visconti, P. E, D. Krapf, J. L. de la Vega-Beltran, J. J. Acevedo, A. Darszon. 2011. Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian J Androl.* 13: 395–405.
6. Leclerc, P., E. de Lamirande, C. Gagnon. 1997. Regulation of protein-tyrosine phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxygen derivatives. *Free Radic Biol Med.* 22: 643–656.
7. Kovtun, S. I., N. P. Galagan, N. Yu. Klimenko. 2011. *Tez. Nauchn. konferentsii, Maksimovka.* 386–390.
8. Ward, C. R., Storey, B. T. 1984. Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay. *Dev Biol.* 104: 287–96.
9. Denisenko, V. Yu., E. N. Boytseva, and T. I. Kuz'mina. 2015. Identifikatsiya putey transduksii kal'tsiya v spermatozoidakh *Bos Taurus* v zavisimosti ot ikh funktsional'nogo statusa – Identification pathways of transduction of calcium *Bos Taurus* spermatozoa according to their functional status. *Tsitologiya*, 3 (in Russian).