

В. Ю. Денисенко, Т. И. Кузьмина, Е. Н. Бойцева

Роль цитоскелета и протеинкиназ А и С в капацитации и акросомной реакции сперматозоидов быков *in vitro*

Аннотация. В статье приведены данные, отражающие результаты исследования роли цитоскелета и протеинкиназ А и С (ПКА и ПКС) в процессах капацитации и акросомной реакции сперматозоидов быков *in vitro*. На основе использования ингибиторного анализа выявлено ключевое значение микрофиламентов и ПКА при капацитации, а микротрубочек и ПКС для акросомной реакции мужских гамет.

Ключевые слова: сперматозоид, капацитация, акросомная реакция, микрофиламенты, микротрубочки, протеинкиназа А, протеинкиназа С, кальций.

Авторы:

Денисенко Виталий Юрьевич — доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биологии развития, ФГБНУ ВНИИГРЖ, Санкт-Петербург-Пушкин, Московское шоссе, 55а, тел. (8) 904-519-36-85, e-mail: vitald@fromru.com;

Кузьмина Татьяна Ивановна — доктор биологических наук, профессор, зав. лабораторией биологии развития ФГБНУ ВНИИГРЖ, Санкт-Петербург-Пушкин, Московское шоссе, 55а, e-mail: prof.kouzmina@mail.ru;

Бойцева Елена Николаевна — аспирантка, младший научный сотрудник лаборатории биологии развития, ФГБНУ ВНИИГРЖ, Санкт-Петербург - Пушкин, Московское шоссе, 55а, тел. (8) 904-646-88-59, e-mail: alena_boiceva@mail.ru.

Введение. Капацитация — это сложный комплекс биохимических изменений, ведущий к приобретению сперматозоидом способности к оплодотворению [1, 2, 3, 4]. На данный момент различными лабораториями получено множество данных касательно этого процесса, однако точный механизм капацитации все еще до конца не ясен. Акросомная реакция (АР) — выброс ферментов, содержащихся в акросоме сперматозоида и необходимых для преодоления оболочек яйцеклетки. Этот процесс возможен только после успешного осуществления капацитации и *in vivo* запускается при контакте сперматозоида с блестящей оболочкой ооцита: активируются каскады сигнализации, ведущие к акросомному экзоцитозу [5]. Известно, что в регуляции вышеуказанных процессов ключевую роль играют кальциевые сигналы [6]; для индукции как капацитации, так и акросомной реакции необходима мобилизация кальция из внутриклеточных депо; также есть данные, свидетельствующие об участии в регуляции капацитации цАМФ и различных протеинкиназ [7] Целью данной работы **явилось** выяснение роли элементов цитоскелета и протеинкиназ А и С (ПКА и ПКС) в капацитации и акросомной реакции сперматозоидов быков.

Условия, материалы и методы исследований.

В экспериментах использовался эякулят быков, получаемый непосредственно перед началом работы. Все использованные реактивы произведены компанией «Sigma». Манипуляции проводились с использованием термостоллика во избежание холодового шока спермиев. Для отмывания и капацитации сперматозоидов быков применялась среда TALP, состоящая из: 100 мМ NaCl, 3.1 мМ KCl, 25 мМ NaHCO₃, 0.3 мМ NaH₂PO₄, 21.6 мМ Lactate (sodium salt), 2 мМ CaCl₂, 0.4 мМ MgCl₂, 10 мМ HEPES, 1 мМ пирувата натрия. Для отмывки спермиев от семенной плазмы использовали данную среду с добавлением поливинилалкоголя (молекулярной массой 30000–70000 Да) в концентрации 1 мг/мл. В такой среде сперму два раза центрифугировали при 300 x g в течение 10 мин. При проведении капацитации к среде TALP вместо поливинилалкоголя добавляли бычий сывороточный альбумин (БСА) в концентрации 6 мг/мл. Капацитацию клеток проводили в течение 4 часов при 38.5⁰С, 95% влажности и 5% CO₂. Для индукции АР после 4-часовой инкубации к суспензии клеток добавляли лизофосфатидилхолин (LPC). Конечная концентрация LPC в образцах составляла 100 мкг/мл, время инкубации — 30 мин. при 39⁰С, 5% CO₂ и 95% влажности. Поступле-

ние реагентов внутрь сперматозоидов обеспечивал хлортетрациклин (ХТЦ), который способен образовывать поры на поверхности клеток, не нанося им критического вреда [8].

Для работы на флуоресцентном микроскопе готовили препараты, окрашенные раствором ХТЦ в концентрации 750 мкМ. Раствор ХТЦ готовили в буфере, который содержит 130 мМ NaCl, 5 мМ L-цистеина, 20 мМ Трис (рН=7.8). Раствор ХТЦ готовили непосредственно перед экспериментом и хранили в темноте, при 4°C. 20 мкл суспензии сперматозоидов и 20 мкл раствора ХТЦ смешивали и инкубировали при 39°C в течение 10 минут. Затем к этой смеси добавляли 10 мкл глутаральдегида в концентрации 0.1% для фиксации. После этого при комнатной температуре 10 мкл суспензии сперматозоидов размещали на предметном стекле и смешивали с 10 мкл 0.22 М 1,4-диазобисциклооктана, растворенного в глицерол/PBS (9:1, v/v). Сперматозоиды (по 200 шт. на стекло в дубликатах) наблюдали с помощью микроскопа Zeiss AXIO imager.A1. Сперму оценивали в соответствии с одним из трех типов окрашивания [9]: равномерная флуоресценция во всей головке (некапацитированные клетки), свободная от флуоресценции полоса в постакросомальном районе (капацитированные клетки), и низкая флуоресценция во всей головке, за исключением тонкой яркой полосы флуоресценции в экваториальном сегменте (акросома-реактивные клетки). В каждом эксперименте оценивалось 800–1000 клеток. Достоверность различия сравниваемых средних значений для 4–5 независимых экспериментов оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента.

Анализ и обсуждение результатов. В серии экспериментов, результаты которых отражены на рисунке 1, был оценен вклад микрофиламентов и ПКА в капацитацию сперматозоидов быков. В образцах, к которым перед инкубацией добавляли совместно теofilлин и ГДФ, наблюдалось увеличение доли капацитированных сперматозоидов относительно контроля, куда добавлялась только среда TALP. В присутствии ингибитора полимеризации микрофиламентов цитохалазина Д и ингибитора ПКА соединения Н-89 при совместном действии теofilлина и ГДФ число капацитированных клеток значительно снижалось. Ранее нами была предложена гипотеза, согласно которой в процессе капацитации происходит перемещение кальция между различными типами внутриклеточных депо, и такое перемещение способен индуцировать теofilлин, действуя в паре с ГДФ [10]. Показанные в данном исследовании результаты свидетельствуют о том, что в данный процесс вовлечены микрофиламенты и ПКА.

В следующей серии экспериментов была рассмотрена роль микротрубочек и ПКС в акросомной реакции сперматозоидов быков. Пролактин, действуя в паре с ГТФ, способен стимулировать перемещение кальция в направлении, обратном таковому при действии теofilлина и ГДФ; такой переход кальция связан с акросомной реакцией [10]. На рисунке 2 показано, что в образцах, куда перед

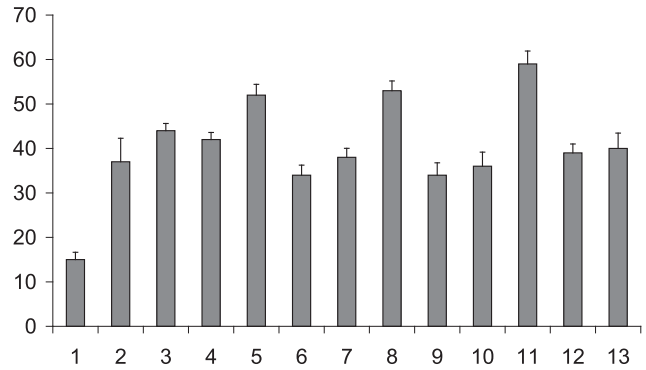


Рис. 1. Влияние ингибиторов полимеризации микрофиламентов цитохалазина Д и ингибитора протеинкиназы А соединения Н-89 на стимулированную теofilлином и ГДФ капацитацию в сперматозоидах быков.

По горизонтали: 1 — контрольные клетки (0 часов инкубации); 2 — контрольные клетки (4 часа инкубации) K4; 3 — K4 + цитохалазин Д в концентрации 10 мкМ; 4 — K4 + н-89 в концентрации 10 мкМ; 11 — совместное действие теofilлина и ГДФ в концентрации 100 и 50 мкМ, соответственно; 12 — совместное действие цитохалазина Д, теofilлина и ГДФ; 13 — совместное действие Н-89, теofilлина и ГДФ. По вертикали — процент капацитированных сперматозоидов. Различия достоверны при: $P < 0.001$ (2 и 11; 5 и 6; 5 и 7; 8 и 9; 8 и 10; 11 и 12; 11 и 13), $P < 0.01$ (2 и 8), $P < 0.05$ (2 и 5).

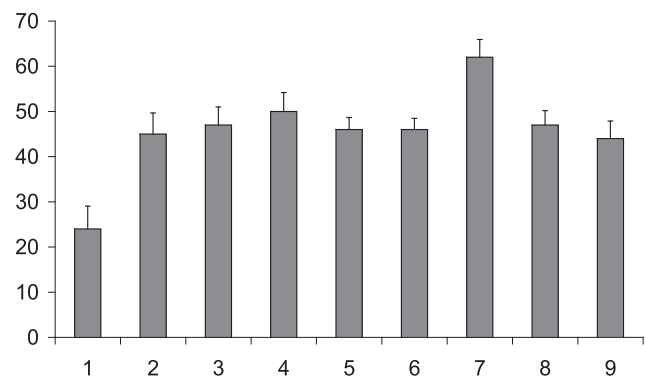


Рис. 2. Влияние пролактина и ГТФ на акросомную реакцию сперматозоидов быков (все клетки обработаны LPC).

По горизонтали: 1 — контрольные клетки на 0 часов; 2 — контрольные клетки через 4 часа инкубации (K4); 3 — K4 совместно с ингибитором нокодазолом; 4 — K4 совместно с Ro 31-8220; 5 — действие 10 мкМ ГТФ; 6 — активация пролактином в концентрации 10 нг/мл; 7 — совместное действие пролактина и ГТФ; 8 — нокодазол (10 мкМ) и последующее совместное действие пролактина и ГТФ; 9 — Ro 31-8220 (2 мкМ) и последующее совместное действие пролактина и ГТФ. По оси ординат — процент клеток спермы на стадии акросомной реакции. Различия достоверны при: $P < 0.001$ (6 и 7), $P < 0.01$ (5 и 7; 7 и 8; 7 и 9).

инкубацией добавляли пролактин и ГТФ, процент клеток, завершивших акросомную реакцию, выше, чем в контроле (К4). В присутствии же ингибитора полимеризации микротрубочек нокодазола и ингибитора ПКС Ro 31-8220 при совместном действии пролактина и ГТФ число акросома-реактивных клеток достоверно ниже.

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в механизмах капацитации, стимулированной теофиллином и ГДФ, участвуют микрофиламенты и ПКА, а в акросомной реакции, индуцированной совместным действием пролактина и ГТФ, ключевую роль играют микротрубочки и ПКС.

Литература

- Harrison R. A. cAMP-dependent protein kinase control of plasma membrane lipid architecture in boar sperm / R. A. Harrison, N. G. Miller // *Mol. Reprod. Devel.* 55: 220–228. 2000.
- Zeng Y. Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates zone pellucid dependent acrosomal secretion / Y. Zeng, E. N. Clark, H. M. Florman // *Devel. Biol.* 171: 554–563. 1995.
- Zeng Y. Ph regulation in mouse sperm: identification of na (+)-, cl (-)-, and hco3 (-)-dependent and arylaminobenzoate-dependent regulatory mechanisms and characterization of their roles in sperm capacitation / Y. Zeng, J. A. Oberdorf, H. M. Florman // *Devel. Biol.* 173: 510–520. 1996.
- White D. R. Relationship between calcium, cyclic AMP, ATP, and intracellular pH and the capacity of hamster spermatozoa to express hyperactivated motility / D. R. White, R. J. Aitken // *Gamete Res.* 1989. 22: 166–177.
- Florman H. M. Regulating the acrosome reaction / H. M. Florman, M. K. Jungnickel, K. A. Sutton // *Inter. J. Devel. Biol.* 52: 503–510. 2008.
- Handrow R. R. Calcium requirement and increased association with bovine sperm during capacitation by heparin / R. R. Handrow, N. L. First, J. J. Parrish // *J. Exp. Zool.* 1989. 25: 174–182.
- Hannah L. Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 39, 59-monophosphate-dependent pathway / L. Galantino-Homer Hannah, E. Visconti Pablo, S. Kopf. *Gregory Biol // Reprod* 1997; 56:707–719.
- Денисенко В. Ю. Эффект гуаниновых нуклеотидов и протеинкиназы С на стимулированное пролактином освобождение Ca²⁺ из внутриклеточных депо ооцитов свиней / В. Ю. Денисенко, Т. И. Кузьмина // *Онтогенез.* 2005. Т. 36. С.1-6.
- Fraser L. R. Ca²⁺-regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis / L. R. Fraser, L. R. Abeydeera, K. Niwa // *Mol. Reprod. Dev.* 1995. 40. 233-241.
- Денисенко В. Ю. Освобождение Ca²⁺ из внутриклеточных депо сперматозоидов *Bos taurus* в зависимости от их функционального состояния / В. Ю. Денисенко, Е. Н. Бойцева, Т. И. Кузьмина // *Цитология.* 57 (3) : 233–239.

Denisenko V. Y., Kuzmina T. I., Boytseva E. N.

Role of cytoskeleton and protein kinase A and C in the capacitation and acrosome reaction of the bull sperm in vitro

Abstract. *The article presents data reflecting the results of research on the role of the cytoskeleton and protein kinases A and C (PKA and PKC) in the process of capacitation and acrosome reaction of bull sperm in vitro. The key role of microfilaments and PKA during capacitation and microtubules and PKC at acrosome reaction of male gametes is revealed on the basis of the use of inhibitory analysis.*

Key words: sperm capacitation, acrosome reaction, microfilaments, microtubules, protein kinase A, protein kinase C, calcium.

Authors:

Denisenko Vitaliy Yurievich — Dr. of Biological Sciences, leading researcher of Laboratory of Developmental Biology, Russian Research Institute for Farm Animal Genetics & Breeding, e-mail: vitald@fromru.com;

Kuzmina Tatiana Ivanovna — Dr. of Biological Sciences, Professor, Head of Laboratory of Developmental Biology, Russian Research Institute for Farm Animal Genetics & Breeding, e-mail: prof.kouzmina@mail.ru;

Boytseva Elena Nikolaevna — postgraduate student of Laboratory of Developmental Biology, Russian Research Institute for Farm Animal Genetics & Breeding, e-mail: alena_boiceva@mail.ru.