

УДК 636.2:612.621

## ОЦЕНКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПОСТЭЯКУЛЯЦИОННОГО СОЗРЕВАНИЯ СПЕРМАТОЗОИДОВ *BOS TAURUS* ХЛОРТЕТРАЦИКЛИНОВЫМ ТЕСТОМ

© 2015 г. Е. Н. Бойцева, В. Ю. Денисенко, Т. И. Кузьмина

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных  
196625, Санкт-Петербург—Пушкин, Московское шоссе, дом 55а

E-mail: prof.kouzmina@mail.ru

Поступила в редакцию 07.05.2014 г.

Окончательный вариант получен 22.06.2015 г.

Оценку показателей постэякуляционного созревания сперматозоидов (капацитация и акросомный экзоцитоз) проводили на основе хлортетрациклинового теста и ингибиторного анализа для идентификации путей транзита кальция внутриклеточных депо при воздействии высокодисперсного кремнезема. Показано, что высокодисперсный кремнезем в концентрации 0.001% стимулирует в сперматозоидах быков капацитацию и не оказывает влияния на акросомный экзоцитоз. Активированная высокодисперсным кремнеземом капацитация ингибировалась в присутствии ингибиторов цитохалазина Д и Н-89, в то время как ингибиторы нокодазол и Ro 31-8220 не оказывали влияния на этот процесс. Совместное действие теофиллина и гуанозиндифосфата стимулирует увеличение количества капацитированных клеток, аналогично действию высокодисперсного кремнезема, ингибиторы цитохалазин Д и Н-89 ограничивают активированную этими соединениями капацитацию сперматозоидов. В то же время, совместное действие пролактина и гуанозинтрифосфата не влияло на капацитацию сперматозоидов быков; добавление ингибиторов нокодазола и Ro 31-8220 не изменило действие пролактина и гуанозинтрифосфата на капацитацию сперматозоидов. Предложена гипотеза, согласно которой повышение криорезистентности сперматозоидов быков под действием высокодисперсного кремнезема, по-видимому, детерминируется переходом  $Ca^{2+}$  между внутриклеточными депо в направлении из инозитолтрифосфат-чувствительных в инозитолтрифосфат-нечувствительные внутриклеточные депо кальция. Полученные данные позволяют расширить представления о биохимических механизмах капацитации, происходящих в сперматозоидах быков.

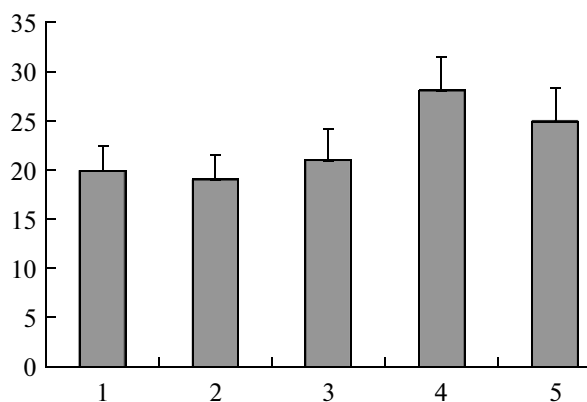
*Ключевые слова:* капацитация, акросомный экзоцитоз, сперматозоиды быков, высокодисперсный кремнезем.

DOI: 10.7868/S0475145015060026

Для интенсификации внедрения инновационных репродуктивных биотехнологий в животноводство необходимо совершенствование базовых методов воспроизводства, в т.ч. искусственного осеменения. Эффективность технологии замораживания мужских гамет определяется также качеством криопротекторов и сред для замораживания. Одним из подходов к оптимизации технологии замораживания сперматозоидов является оптимизация криосред путем введения в них наноконструкций, к числу которых относится высокодисперсный кремнезем. Высокодисперсный кремнезем является биологически активным веществом, применение которого способствует повышению жизнеспособности клеток. Предварительная обработка перед замораживанием сперматозоидов быков высокодисперсным кремнеземом приводила после размораживания клеток к повышению подвижности спермы, увеличению показателей выживаемости клеток и стабилизации их

мембран (Чуйко, 2003). Механизм действия высокодисперсного кремнезема на повышение жизнеспособности замороженных сперматозоидов неизвестен.

Эякулированные сперматозоиды не способны к оплодотворению. Для приобретения компетентности мужских гамет к оплодотворению, сперматозоиды должны завершить процесс “созревания” (капацитации) в женских половых путях. Только капацитированные сперматозоиды способны к успешному оплодотворению яйцеклетки (Chang, 1951). Происходящие при этом морфологические и биохимические изменения позволяют сперматозоиду связываться с яйцеклеткой и опосредуют акросомный экзоцитоз (Yanagimachi, 1994). Хотя молекулярные механизмы капацитации выяснены не полностью, многочисленные исследования показали наличие структурных и биохимических преобразований в сперматозоидах, таких как: изменения в составе и



**Рис. 1.** Влияние различных концентраций высокодисперсного кремнезема (ВДК) на капацитацию сперматозоидов быков. По горизонтали – 1 – контроль на 0 часов; 2 – контроль через 4 часа инкубации; 3 – действие ВДК в концентрации 0.01%; 4 – действие ВДК в концентрации 0.001%; 5 – действие ВДК в концентрации 0.0001%. По вертикали – процентное содержание капацированных клеток. Различия достоверны при:  $P < 0.05$  (2 и 4).

текучести мембраны (Lin, Kan, 1996), увеличение концентрации цитоплазматического кальция (Visconti et al., 1995), рост цитоплазматического pH (Vredenburg-Wilberg, Parrish, 1995), активация ионных каналов (Visconti et al., 2011) и образование активных форм кислорода (Leclerc et al., 1997).

Цель настоящего исследования – с использованием хлортетрациклинового теста и ингибиторного анализа идентифицировать пути транзита кальция между внутриклеточными депо и охарактеризовать коммуникационные взаимодействия структурных элементов цитоскелета при воздействии высокодисперсного кремнезема в процессе постэякуляционного созревания (капацитация и акросомная реакция) сперматозоидов.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Фирма-производитель всех использованных реагентов – Sigma. В работе была использована свежая сперма, полученная в день эксперимента от быков айрширской и голштинской пород. В каждом опыте использовался эякулят от трех разных быков. Все манипуляции проводились с использованием термостоллика во избежание холодового шока сперматозоидов. Клетки отмывали от семенной плазмы двукратным центрифугированием при 300 x g в течение 10 мин в среде Sp-TALP, состоящей из: 100 mM NaCl, 3.1 mM KCl, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 21.6 mM Lactate (sodium salt), 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.4 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 1 mM пирувата и 0.1% поливинилалкоголя (молекулярной массой 30000–70000 Да), pH которой составлял 7.4. Для капацитации в среду Sp-TALP вместо поливинилалкоголя добавляли

бычий сывороточный альбумин в концентрации 6 мг/мл. Капацитацию клеток проводили в течение 4 часов при 38.5°C, 95% влажности и 5% CO<sub>2</sub>. Для активации акросомного экзоцитоза использовали лизофосфатидилхолин в концентрации 100 мкМ, который добавляли к предварительно капацированным клеткам спермы. Продолжительность акросомного экзоцитоза в присутствии лизофосфатидилхолина составляла 30 мин при 38.5°C, 95% влажности и 5% CO<sub>2</sub>. Затем после прохождения капацитации или акросомного экзоцитоза из каждого экспериментального образца брали по 20 мкл и смешивали клеточную суспензию с 20 мкл свежеприготовленного 750 мкМ раствора хлортетрациклина. Для окраски клеток раствор хлортетрациклина готовили на основе среды, содержащей 130 mM NaCl, 5 mM L-цистеина, 20 mM Трис (pH 7.8). Клетки с хлортетрациклином инкубировали в течение 10 мин при 38.5°C, после чего в эту смесь для фиксации добавляли 10 мкл 25% глутаральдегида в 1М Трисе (pH 7.8) до конечной концентрации глутаральдегида 0.1%. Данная концентрация фиксатора позволяет флуоресценции оставаться стабильной в течение 2 часов и не оказывает губительного влияния на клетки (Ward, Storey, 1984). Фиксированные клетки в количестве 15 мкл смешивали с 15 мкл 0.22 М 1,4-дiazобисциклооктана, растворенного в смеси глицерол/среда Дюльбекко (9 : 1, v/v). После этого 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 для ногтей. Препараты наблюдали под микроскопом Zeiss AXIO с фазовым контрастом и эпифлуоресцентной оптикой (возбуждение при 400–440 нм и излучение при 470 нм). В каждой группе клетки (200 клеток в эксперименте) были оценены и классифицированы по принадлежности к одному из типов окрашивания: с яркой флуоресценцией по всей головке спермы (некапацированные, акросома-интактные клетки); свободная от флуоресценции полоса в постакросомальном районе (капацированные, акросома-интактные клетки); слабая или отсутствующая флуоресценция всей головки сперматозоида, за исключением тонкой, яркой полосы в экваториальном сегменте (капацированные, акросома-реактивные клетки). Достоверность различия сравниваемых средних значений для 4–5 независимых экспериментов оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На рис. 1 представлены данные экспериментов, в которых отражено влияние различных концентраций высокодисперсного кремнезема на

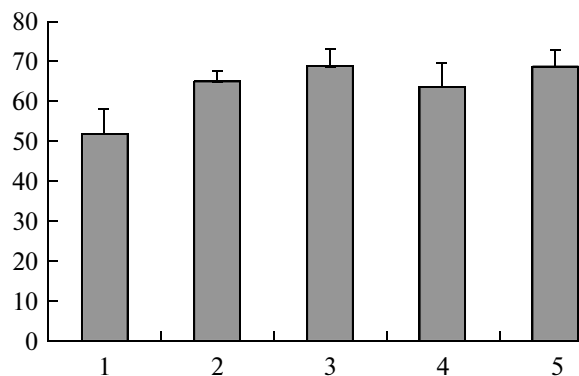
капацитацию сперматозоидов быков. Обнаружено, что при использовании различных концентраций высокодисперсного кремнезема (от 0.01 до 0.0001%) стимулирование капацитации мужских гамет происходило только при воздействии данного соединения в концентрации 0.001% и отсутствовало при действии других концентраций. Исходя из полученных данных, в последующих экспериментах для изучения капацитации использовали высокодисперсный кремнезем в концентрации 0.001%.

На рис. 2 представлены данные о влиянии различных концентраций высокодисперсного кремнезема (0.01, 0.001 и 0.0001%) на прохождение акросомного экзоцитоза в сперматозоидах быков. Воздействие всех изученных концентраций высокодисперсного кремнезема не оказывало влияние на акросомный экзоцитоз в сперматозоидах быков.

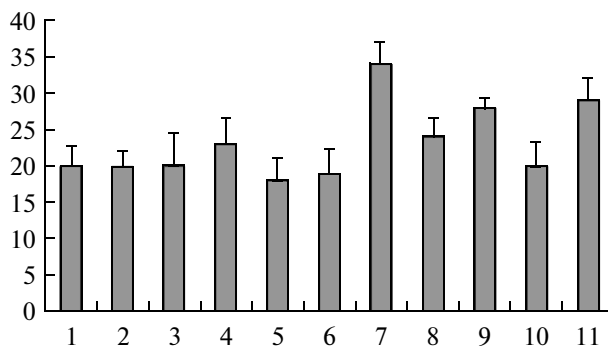
В следующей серии экспериментов, данные которых отражены на рис. 3, оценено участие в стимулированной высокодисперсным кремнеземом капацитации сперматозоидов быков микротрубочек, микрофиламентов, протеинкиназ А и С, для чего в работе использовались соответствующие ингибиторы. Обнаружено, что в контрольных (необработанных высокодисперсным кремнеземом) сперматозоидах 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 влияло на процентное содержание капацитированных клеток. В то же время на стимулированную высокодисперсным кремнеземом капацитацию сперматозоидов добавление цитохалазина Д и Н-89 производило ингибирующий эффект, в отличие от нейтрального действия нокодазола и Ro 31-8220.

Для введения в сперматозоиды быков гуанозинтрифосфата и гуанозиндифосфата использовали хлортетрациклин, который способствует проникновению этих соединений в клетки (Денисенко, Кузьмина, 2005). Обработка клеток хлортетрациклином в концентрации 20 мкМ в течение 30 мин обеспечивала возможность для входа гуанозинтрифосфата и гуанозиндифосфата в сперматозоиды. На рис. 4 показаны данные влияния пролактина и гуанозинтрифосфата на капацитацию сперматозоидов быков. Добавленные отдельно пролактин в концентрации 10 нг/мл или гуанозинтрифосфат в концентрации 10 мкМ не стимулировали увеличение количества капацитированных клеток. Также не изменялась концентрация капацитированных клеток при совместном действии пролактина и гуанозинтрифосфата в отсутствие и в присутствии ингибиторов нокодазола и Ro 31-8220.

Характер влияния теофиллина и гуанозиндифосфата на капацитацию сперматозоидов быков

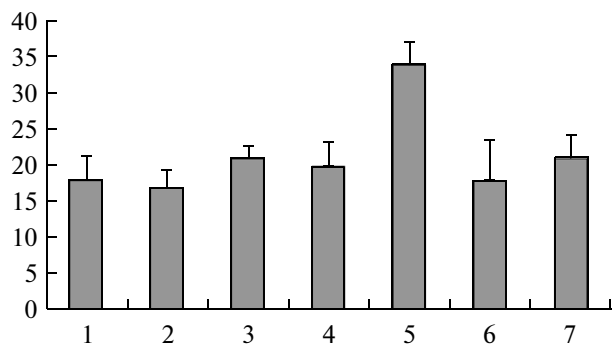


**Рис. 2.** Влияние различных концентраций высокодисперсного кремнезема (ВДК) на акросомный экзоцитоз в сперматозоидах быков. По горизонтали – 1 – контроль на 0 часов; 2 – контроль через 4 часа инкубации; 3 – действие ВДК в концентрации 0.01%; 4 – действие ВДК в концентрации 0.001%; 5 – действие ВДК в концентрации 0.0001%. По вертикали – процентное содержание сперматозоидов с акросомным экзоцитозом.

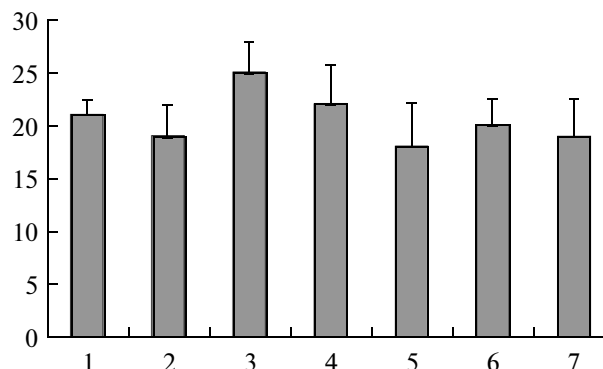


**Рис. 3.** Влияние ингибиторов полимеризации микрофиламентов и микротрубочек, протеинкиназы А и С на стимулированную высокодисперсным кремнеземом (ВДК) капацитацию в сперматозоидах быков. По горизонтали – 1 – контроль на 0 часов (K1); 2 – контроль через 4 часа инкубации (K2); 3 – K2 совместно с ингибитором полимеризации микрофиламентов цитохалазином Д в концентрации 10 мкМ; 4 – K2 совместно с ингибитором полимеризации микротрубочек нокодазолом в концентрации 10 мкМ; 5 – K2 совместно с ингибитором протеинкиназы А Н-89 в концентрации 10 мкМ; 6 – K2 совместно с ингибитором протеинкиназы С Ro 31-8220 в концентрации 5 мкМ; 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 капацитированных клеток. Различия достоверны при:  $P < 0.05$  (7 и 8),  $P < 0.001$  (7 и 10).

представлен на рис. 5. В экспериментах теофиллин и гуанозиндифосфат использовали в концентрациях 100 мкМ. При совместном действии теофиллина и гуанозиндифосфата было выявлено значительное увеличение количества капацитированных клеток; действие отдельно теофиллина



**Рис. 4.** Влияние теofilлина и ГДФ на капациацию сперматозоидов быков. По горизонтали: 1 – контрольные клетки на 0 часов; 2 – контрольные клетки через 4 часа инкубации; 3 – активация теofilлином в концентрации 100 мкМ; 4 – действие 100 мкМ ГДФ; 5 – совместное действие теofilлина и ГДФ; 6 – обработка цитохалазином Д в концентрации 10 мкМ и последующее совместное действие теofilлина и ГДФ; 7 – обработка Н-89 в концентрации 10 мкМ и последующее совместное действие теofilлина и ГДФ. По оси ординат – процент капацированных клеток. Различия достоверны при:  $P < 0.05$  (5 и 6; 5 и 7),  $P < 0.01$  (3 и 5; 4 и 5).



**Рис. 5.** Влияние пролактина и ГДФ на капациацию сперматозоидов быков. По горизонтали: 1 – контрольные клетки на 0 часов; 2 – контрольные клетки через 4 часа инкубации; 3 – активация пролактином в концентрации 10 нг/мл; 4 – действие 10 мкМ ГДФ; 5 – совместное действие пролактина и ГДФ; 6 – обработка нокодазолом в концентрации 10 мкМ и последующее совместное действие пролактина и ГДФ; 7 – обработка Ro 31-8220 в концентрации 5 мкМ и последующее совместное действие пролактина и ГДФ. По оси ординат – процент капацированных клеток.

или гуанозиндифосфата не стимулировало рост количества капацированных клеток в сравнении с контролем. Для проверки участия в стимулированном совместным действием теofilлина и гуанозиндифосфата процессе капациации сперматозоидов быков микрофиламентов и протеинкиназы А использовали ингибиторы цитохалазин Д и Н-89. Результаты исследований показали, что в присутствии этих ингибиторов стимулированное совместным действием теofilлина и гуанозиндифосфата увеличение количества капацированных сперматозоидов отсутствовало.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Согласно гипотезе Mullaney et al., гуанозинтрифосфат опосредует процесс образования связи между двумя типами внутриклеточных депо – рианодин- и инозитолтрифосфат-чувствительными и обеспечивает переход  $Ca^{2+}$  из рианодин- в инозитолтрифосфат-чувствительные внутриклеточные депо. При совместном действии гуанозинтрифосфата и инозитолтрифосфата в клетках отмечается дополнительное освобождение  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо, что свидетельствует о перемещении  $Ca^{2+}$  между различными внутриклеточными депо (Mullaney et al., 1987; Ghosh et al., 1989).

Рецепторы к гуанозинтрифосфату и гуанозиндифосфату на поверхности клеток отсутствуют, в связи с чем они самостоятельно в клетки не проникают. Обычно в случаях, когда необходимо обеспечить доступ в клетки соединений, самостоятельно в них не проникающих, проводят проце-

ду пермеабиллизации, то есть с помощью детергентов делают поры на поверхности клеток, через которые внутрь клеток эти соединения (например, гуаниновые нуклеотиды) проникают (Wolf et al., 1987). Однако эта процедура оказывает неблагоприятное воздействие на клетки. Для обеспечения входа гуанозинтрифосфата и гуанозиндифосфата в сперматозоиды в наших экспериментах использовался другой подход. Ранее нами было показано, что антибиотик хлортетрациклин, который также является флуоресцентным зондом для измерения кальция во внутриклеточных депо, способен образовывать поры на поверхности клеток, через которые в них проникают гуанозинтрифосфат и гуанозиндифосфат (Денисенко, Кузьмина, 2005). Использование хлортетрациклина не оказывало влияние на жизнеспособность клеток, так как обработанные им ооциты созревали до стадии метафазы II (Кузьмина, Малышев, 1991). Поэтому для обеспечения входа гуанозинтрифосфата и гуанозиндифосфата в сперматозоиды использовали хлортетрациклин.

Прохождение процессов капациации зависит от присутствия внеклеточного кальция и связано с увеличением внутриклеточной концентрации кальция (Handrow et al., 1989). Изменения в плазматических мембранах сперматозоидов, таких как потеря холестерина, стимулируют передачу сигнала, вызывающую капациацию (Visconti et al., 1999). Эти мембранные изменения, как предполагают, необходимы для увеличения проницаемости для таких ионов, как  $Ca^{2+}$  и  $HCO_3^-$ , которые входят в цитоплазму и активируют аденилатцикла-

зу для образования цАМФ (Litvin et al., 2003). В экспериментах на сперматозоидах быков для стимуляции капацитации нами использовалась инкубация клеток с  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{HCO}_3^-$  и бычьим сывороточным альбумином.

В сперматозоидах быков пролактин и гуанозинтрифосфат вызывают освобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из различных внутриклеточных депо: пролактин стимулирует освобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из инозитолтрифосфат-чувствительных внутриклеточных депо, а гуанозинтрифосфат – из инозитолтрифосфат-нечувствительных. Также при совместном действии пролактина и гуанозинтрифосфата в сперматозоидах быков отмечается дополнительное освобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо (Бойцева и др., 2014). Инкубация сперматозоидов в течение 4 часов в присутствии пролактина или гуанозинтрифосфата, а также при их совместном действии, не оказывала влияния на количество капацитированных клеток. Следовательно, стимулированное при совместном действии пролактина и гуанозинтрифосфата перемещение  $\text{Ca}^{2+}$  из инозитолтрифосфат-нечувствительных в инозитолтрифосфат-чувствительные внутриклеточные депо не вызывает активацию процессов капацитации. В то же время при совместном действии теофиллина и гуанозиндифосфата в сперматозоидах быков через 4 часа инкубации отмечали увеличение количества капацитированных клеток. Ранее при проведении экспериментов на ооцитах свиньи мы предположили, что совместное действие теофиллина и гуанозиндифосфата стимулирует перемещение  $\text{Ca}^{2+}$  между различными внутриклеточными депо в направлении из инозитолтрифосфат-чувствительных в инозитолтрифосфат-нечувствительные внутриклеточные депо (Денисенко, Кузьмина, 2004).

По аналогии заключаем, что активация процессов капацитации в сперматозоидах быков связана с переходом  $\text{Ca}^{2+}$  между различными внутриклеточными депо в направлении из инозитолтрифосфат-чувствительных в инозитолтрифосфат-нечувствительные депо.

Модификация внутриклеточных депо с помощью гуанозинтрифосфата детерминируется элементами цитоскелета (Hajnoszky et al., 1994). Гуанозиндифосфат необходим для полимеризации тубулина (Timasheff, Grisham, 1980), он контролирует организацию цитоскелета через Rho семейство малых G-белков (Chardin et al., 1989; Paterson et al., 1990). Факт, что каждый из этих компонентов модулируется гормоном или ростовыми факторами (Downey et al., 1991; Ridley, Hall, 1992), предполагает, что коммуникация между внутриклеточными депо необходима для внутриклеточной регуляции.

Как и микротрубочки, микрофиламенты участвуют в образовании связи между различны-

ми внутриклеточными структурами. К одной из внутриклеточных структур относится эндоплазматический ретикулум, который является в клетке основным внутриклеточным депо кальция и образуется в процессе слияния мембран везикул. В регуляцию этого процесса вовлекаются различные цитозольные факторы (Berridge, 2002). Цитоскелет играет значительную роль в регуляции входа внеклеточного кальция, вызванного опустошением внутриклеточных депо, путем изменения взаимодействия между их главными молекулярными компонентами. Использование ингибитора полимеризации микрофиламентов цитохалазина Д снижало взаимодействие между эндоплазматическим ретикулумом и  $\text{Ca}^{2+}$ -проницаемыми каналами в плазматической мембране (Galán et al., 2011). В сперматозоидах актин, составная часть микрофиламентов, содержится в акросомном пространстве, экваториальном и постакросомальном районе, а также в хвосте (Howes et al., 2001). Процессы полимеризации и деполимеризации актина могут оказывать влияние на функции спермы. Было показано, что ингибирование полимеризации актина при действии ингибитора цитохалазина Д снижает способность к оплодотворению спермы кабанов (Castellani-Ceresa et al., 1993). На сперматозоидах быков получены данные, что полимеризация микрофиламентов происходит во время прохождения процессов капацитации (Brenner et al., 2003). В наших исследованиях на сперматозоидах быков также было показано, что элементы цитоскелета участвуют в регуляции функций этих клеток. В присутствии ингибитора полимеризации микрофиламентов цитохалазина Д отмечали снижение количества капацитированных сперматозоидов, стимулированное совместным действием теофиллина и гуанозиндифосфата.

Кроме элементов цитоскелета, в регуляции кальция во внутриклеточных депо также участвуют и протеинкиназы. Показано, что активатор протеинкиназы А цАМФ способен контролировать содержание  $\text{Ca}^{2+}$  во внутриклеточных депо путем модуляции  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов на поверхности клетки (Lefkimmatis et al., 2009). На сперматозоидах быков добавление дбцАМФ стимулирует полимеризацию актина, тогда как добавление ингибитора Н-89 ингибирует полимеризацию актина, что приводит к блокированию прохождения процессов капацитации (Galantino-Homer et al., 1997). Активация протеинкиназы С оказывает ингибирующее влияние на стимулированное инозитолтрифосфатом освобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо (Sipma et al., 1996). На сперматозоидах быков было продемонстрировано, что стимулированное совместным действием теофиллина и гуанозиндифосфата увеличение количества капацитированных клеток снижалось в присутствии ингибитора протеинкиназы А.

Таким образом, стимулированное совместным действием теофиллина и гуанозиндифосфата увеличение капацированных клеток, вероятно, связано с переходом кальция между различными внутриклеточными депо в направлении из инозитолтрифосфат-чувствительных в инозитолтрифосфат-нечувствительные внутриклеточные депо, в организации и регуляции которого участвуют микрофиламенты и протеинкиназа А.

Добавление высокодисперсного кремнезема в стандартную среду для замораживания стимулирует жизнеспособность эякулированных сперматозоидов быков (Чуйко, 2003). Использование высокодисперсного кремнезема в концентрации 0.01% перед криоконсервацией спермы быков приводило к повышению подвижности и выживаемости сперматозоидов. Повышение жизнеспособности сперматозоидов, вероятно, происходило за счет сохранности большего количества ферментов, принимающих участие в процессе искусственного оплодотворения животных.

В наших экспериментах инкубация сперматозоидов быков с высокодисперсным кремнеземом приводила к увеличению количества капацированных клеток и не оказывала влияние на количество клеток с акросомной реакцией. Как и в случае совместного использования теофиллина и гуанозиндифосфата, в стимулированном высокодисперсным кремнеземом увеличении количества капацированных клеток участвовали микрофиламенты и протеинкиназа А. Так как характер действия высокодисперсного кремнезема на сперматозоиды быков аналогичен совместному действию теофиллина и гуанозиндифосфата — в обоих случаях при использовании вышеуказанных соединений возрастает количество капацированных клеток, то можно предположить, что при использовании высокодисперсного кремнезема перемещение  $Ca^{2+}$  между различными внутриклеточными депо также происходит в направлении из инозитолтрифосфат-чувствительных в инозитолтрифосфат-нечувствительные внутриклеточные депо.

Принимая во внимание все вышеизложенные факты, предлагаем следующую гипотезу. Повышение криорезистентности сперматозоидов быков при воздействии высокодисперсного кремнезема, по-видимому, детерминируется переходом  $Ca^{2+}$  между внутриклеточными депо в направлении из инозитолтрифосфат-чувствительных в инозитолтрифосфат-нечувствительные внутриклеточные депо кальция.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Бойцева Е.Н., Денисенко В.Ю., Кузьмина Т.И. Воздействие пролактина и ГТФ на освобождение  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо сперматозоидов быков. Жодино. 2014. тезисы.

Денисенко В.Ю., Кузьмина Т.И. Влияние гуаниновых нуклеотидов и протеинкиназы С на стимулированное теофиллином и цАМФ освобождение  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо ооцитов свиней // Цитология. 2004. Т. 46. С. 557–560.

Денисенко В.Ю., Кузьмина Т.И. Эффект гуаниновых нуклеотидов и протеинкиназы С на стимулированное пролактином освобождение  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо ооцитов свиней // Онтогенез. 2005. Т. 36. С. 1–6.

Кузьмина Т.И., Малышев А.Ю. Гипераккумуляция мембрансвязанного  $Ca^{2+}$  в ооцитах коров во время экспансии и разрушения ооцит-кумулюсного комплекса // С.-Петербург. ВНИИГРЖ. 1991. Т. 129. С. 3–7.

Чуйко А. Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния. Киев. 2003. С. 1–415.

Berridge M.J. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle // Cell Calcium. 2002. V. 32. P. 235–249.

Brener E., Rubinstein S., Cohen G. et al. Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction // Biol. Reprod. 2003. V. 68. P. 837–845.

Castellani-Ceresca L., Mattioli M., Radaelli G. et al. Actin polymerization in boar spermatozoa: fertilization is reduced with use of cytochalasin D // Mol. Reprod. Dev. 1993. V. 36. P. 203–211.

Chang M.C. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into fallopian tubes // Nature 1951. V. 168. P. 697–698.

Chardin P., Boquet P., Madaule P. The mammalian G protein rhoC is ADP-ribosylated by Clostridium botulinum exoenzyme C3 and affects actin microfilaments in Vero cells // EMBO J. 1989. V. 8. P. 1087–1092.

Downey G. P., Elson E. L., Schwab B. et al. Biophysical properties and microfilament assembly in neutrophils: modulation by cyclic AMP // J. Cell Biol. 1991. V. 114. P. 1179–1190.

Galán C., Dionisio N., Smani T. et al. The cytoskeleton plays a modulatory role in the association between STIM1 and the  $Ca^{2+}$  channel subunits Orail1 and TRPC1 // Biochem. Pharmacol. 2011. V. 82. P. 400–410.

Galantino-Homer H.L., Visconti P.E., Kopf G.S. Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by cyclic adenosine 39,59-monophosphate-dependent pathway // Biol. Reprod. 1997. V. 56. P. 707–719.

Ghosh T.K., Mullaney J.M., Tarazy F.I. et al. GTP-activated communication between distinct inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive and -insensitive calcium pools // Nature 1989. V. 340. P. 236–239.

Hajnoczky G., Lin C., Thomas A. Luminal communication between intracellular calcium stores modulated by GTP and the cytoskeleton // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 10280–10287.

Handrow R.R., First N.L., Parrish J.J. Calcium requirement and increased association with bovine sperm during capacitation by heparin // J. Exp. Zool. 1989. V. 25. P. 174–182.

Howes E.A., Hurst S.M., Jones R. Actin and actin-binding proteins in bovine spermatozoa: potential role in membrane remodeling and intracellular signaling during

- epididymal maturation and the acrosome reaction // *J. Androl.* 2001. V. 22. P. 62–72.
- Leclerc P., de Lamirande E., Gagnon C. Regulation of protein-tyrosine phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxygen derivatives // *Free Radic. Biol. Med.* 1997. V. 22. P. 643–656.
- Lefkimmiatis K., Srikanthan M., Maiellaro I. et al. Store-operated cyclic AMP signalling mediated by STIM1 // *Nat. Cell Biol.* 2009. V. 11. P. 433–442.
- Lin Y., Kan F.W. Regionalization and redistribution of membrane phospholipids and cholesterol in mouse spermatozoa during *in vitro* capacitation // *Biol. Reprod.* 1996. V. 55. P. 1133–1146.
- Litvin T.N., Kamenetsky A.Z., Buck J. et al. Kinetic properties of “soluble” adenylyl cyclase. Synergism between calcium and bicarbonate // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 15922–15926.
- Mullaney J.M., Chueh S.H., Ghosh T.K. et al. Intracellular calcium uptake activated by GTP. Evidence for a possible guanine nucleotide-induced transmembrane conveyance of intracellular calcium // *J. Biol. Chem.* 1987. V. 262. P. 13865–13872.
- Paterson H.F., Self A.J., Garrett M.D. et al. Microinjection of recombinant p21rho induces rapid changes in cell morphology // *J. Cell Biol.* 1990. V. 111. P. 1001–1007.
- Ridley A.J., Hall A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors // *Cell* 1992. V. 70. P. 389–399.
- Sipma H., van der Zee L., van den Akker J. et al. The effect of the PKC inhibitor GF109203X on the release of Ca<sup>2+</sup> from internal stores and Ca<sup>2+</sup> entry in DDT1 MF-2 cells // *Br. J. Pharm.* 1996. V. 119. P. 730–736.
- Timasheff S.N., Grisham L.M. *In vitro* assembly of cytoplasmic microtubules // *Annu. Rev. Biochem.* 1980. V. 49. P. 565–591.
- Visconti P.E., Bailey J.L., Moore G.D. et al. Capacitation of mouse spermatozoa, I: correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation // *Devel.* 1995. V. 121. P. 1129–1137.
- Visconti P.E., Galantino-Homer H., Ning X.P. et al. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 3235–3242.
- Visconti P.E., Krampf D., Luis de la Vega-Beltran J. et al. Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation // *Asian J. Androl.* 2011. V. 13. P. 395–405.
- Vredenburg-Wilberg W.L., Parrish J.J. Intracellular pH of bovine sperm increases during capacitation // *Mol. Reprod. Dev.* 1995. V. 40. P. 490–502.
- Ward C.R., Storey B.T. Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay // *Dev. Biol.* 1984. V. 104. P. 287–296.
- Wolf B.A., Florholmen J., Colca J.R. et al. GTP mobilization of Ca<sup>2+</sup> from the endoplasmic reticulum of islets. Comparison with myo-inositol 1,4,5-trisphosphate // *Biochem. J.* 1987. V. 242. P. 137–141.
- Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In: Knobil E., Neill J. (eds.), *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press; 1994: 189–317.

## Evaluation of Indicators of Postejaculation Maturation of Spermatozoa of *Bos taurus* Using a Chlortetracycline Test

E. N. Boitseva, V. Yu. Denisenko, and T. I. Kuz'mina

*Russian Scientific Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding,  
Moskovskoe shosse 55a, St. Petersburg–Pushkin, 196625 Russia  
e-mail: profkouzmina@mail.ru*

Received May 7, 2014; in final form, June 22, 2015

Postejaculation maturation of spermatozoa (capacitation and acrosomal exocytosis) in bovine sperm was assessed using the method of staining with chlortetracycline and inhibitor analysis to identify the transition ways of calcium of intracellular depots under the influence of highly dispersed silica. It was shown that highly dispersed silica in a concentration of 0.001% stimulates capacitation but has no impact on the acrosome exocytosis in bovine sperm. Activated by highly dispersed silica, capacitation was inhibited in the presence of cytochalasin D and H-89 inhibitors, whereas nocodazole and Ro 31-8220 had no influence on this process. The joint action of theophylline and guanosine diphosphate stimulates an increase in the amount of capacitated sperm cells, similarly to highly dispersed silica; inhibitors cytochalasin D and H-89 restrict the capacitation of sperm activated by these compounds. At the same time, the joint effect of prolactin and guanosine triphosphate had no effect on the capacitation of spermatozoa; addition of nocodazole and Ro 31-8220 inhibitors did not alter the effect of prolactin and guanosine triphosphate on the capacitation of sperm. A hypothesis was put forward, according to which increase in the cryoresistance of spermatozoa of bulls under the influence of highly dispersed silica is, apparently, determined by the transition of Ca<sup>2+</sup> between the intracellular stores in the direction from inositol triphosphate-sensitive to inositol triphosphate-insensitive intracellular stores of calcium. The obtained data allow us to expand the notion of the biochemical mechanisms of capacitation in the spermatozoa of bulls.

**Keywords:** capacitation, acrosomal exocytosis, bovine sperm, highly dispersed silica