

## ИНТРАЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКАЯ ТРАНСДУКЦИЯ КАЛЬЦИЯ В СПЕРМАТОЗОИДАХ *BOS TAURUS* ПРИ КАПАЦИТАЦИИ И АКРОСОМНОЙ РЕАКЦИИ

© 2020 г. В. Ю. Денисенко<sup>а</sup>, Т. И. Кузьмина<sup>а</sup>, \*

<sup>а</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал ФГБНУ “Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста” (ВНИИГРЖ), Московское шоссе, 55а, Санкт-Петербург, Пушкин, 196601 Россия

\*e-mail: prof.kouzmina@mail.ru

Поступила в редакцию 08.02.2020 г.

После доработки 25.03.2020 г.

Принята к публикации 27.03.2020 г.

Проведен мониторинг показателей интенсивности флуоресценции комплекса мембрана-кальций-хлортетрациклин в сперматозоидах быков в процессах капацитации и акросомной реакции с использованием ингибиторного анализа. Выявлено, что добавление отдельно пролактина, дбцАМФ, ГТФ или ГДФ стимулировало в сперматозоидах освобождение  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо (ВКД). При совместном действии пролактина и ГТФ, а также дбцАМФ и ГДФ отмечалось дополнительное освобождение  $Ca^{2+}$  из ВКД. Предварительная инкубация в присутствии негидролизующих ГДФβS или ГДФγS ингибировала освобождение  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо, стимулированное ГТФ или ГДФ, но не оказывала влияние на активированное пролактином или дбцАМФ освобождение  $Ca^{2+}$  из ВКД. В то же время при совместном действии пролактина и ГТФ, а также дбцАМФ и ГДФ по-прежнему присутствует дополнительный выход  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо сперматозоидов, предварительно проинкубированных в присутствии ГДФβS или ГДФγS. Анализ локализации флуоресценции хлортетрациклина в сперматозоидах выявил, что после инкубации сперматозоидов в присутствии дбцАМФ, ГДФ или их совместном воздействии наибольшее количество капацитированных клеток регистрировали при совместном действии этих двух соединений. Инкубация клеток при добавлении пролактина, ГТФ или их совместном действии приводила к увеличению количества акросомных клеток, причем наибольшее количество фиксировали при совместном действии пролактина и ГТФ. Таким образом, допустимо предположить, что мобилизация кальция из внутриклеточных депо детерминирует рост количества капацитированных сперматозоидов быков, эффект наиболее выражен при совместном действии дбцАМФ и ГДФ, и увеличение количества акросомных клеток, максимальное количество которых выявляли при совместном действии пролактина и ГТФ.

**Ключевые слова:** капацитация, акросомная реакция, кальций, сперматозоиды быков

DOI: 10.31857/S0475145020040035

### ВВЕДЕНИЕ

Для контакта сперматозоида с яйцеклеткой и акросомального экзоцитоза, мужские гаметы млекопитающих должны пройти ряд биохимических превращений в женском репродуктивном тракте, т.е. подвергнуться капацитации. Капацитация характеризуется различными мембранными модификациями, приводящими к снижению содержания холестерина (Brouwers et al., 2011). При удалении холестерина снижается текучесть плазматической мембраны сперматозоидов, что приводит к увеличению ее проницаемости для различных ионов (Gadella, Voerke, 2016). В результате изменения про-

ницаемости мембраны изменяются потоки  $Ca^{2+}$  и  $HCO_3^-$ , что ведет к активации аденилилциклазы и изменению уровня cAMP (Narayana, 2013). Также во время капацитации происходят многочисленные биохимические изменения, в т.ч. увеличение концентраций интрацитоплазматического кальция, цАМФ, внутриклеточного pH и фосфорилирования белков по тирозину (Harrison, Gadella, 2005; Pons-Rejraji et al., 2009).

Регулирование внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$  является одним из важнейших событий, происходящих во время капацитации (Darszon et al., 2005). В опубликованных работах было по-

казано, что капацитация является  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимым процессом (Rodríguez et al., 2012), и кальций действует на различные сигнальные пути в сперме (Lawson et al., 2008). Увеличение pH, концентрации цАМФ и фосфорилирование тирозина не происходит, когда сперматозоиды инкубируют в бескальциевой среде (Battistone et al., 2013). Более того, аденилил циклаза спермы, которая значительно активируется  $\text{HCO}_3^-$ , также активируется  $\text{Ca}^{2+}$  (Buffone et al., 2014). Механизмы, участвующие в регуляции  $\text{Ca}^{2+}$  во время капацитации, изучены недостаточно полно.

Имеются доказательства того, что акросомная реакция сперматозоидов, выражающаяся в виде экзоцитоза при приближении сперматозоида к ооциту, является  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимым процессом (Almadaly et al., 2015). Внеклеточный кальций необходим для акросомной реакции и использование некоторых блокаторов ионных каналов ингибирует этот процесс, указывая на важную роль этих ионов (Pons-Rejraji et al., 2009). В сперматозоидах некоторых видов грызунов, которые инкубировали в бескальциевой среде, акросомная реакция не проходила до тех пор, пока в среду не добавляли кальций (Jimenez-Gonzalez et al., 2006). Хотя точные механизмы, приводящие к увеличению  $\text{Ca}^{2+}$  в сперматозоидах во время акросомной реакции не известны, имеются данные, что необходимый для экзоцитоза акросомальных везикул  $\text{Ca}^{2+}$  входит в клетки через потенциалзависимые каналы Т-типа (Flogman et al., 2008). Кроме того, показано, что внутриклеточные депо  $\text{Ca}^{2+}$  также участвуют в инициации акросомной реакции. В отсутствие внеклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  в капацитированных мышинных сперматозоидах акросомная реакция активировалась при действии тапсигаргина, который стимулировал освобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо (Herrick et al., 2005).

Использование флуоресцентных красителей, таких как Quin-2 и Fura-2 (Tsien et al., 1982; Nalet, 2016), позволяет измерять концентрацию цитоплазматического  $\text{Ca}^{2+}$ , однако эти зонды не дают ответ на вопрос об источнике увеличения  $\text{Ca}^{2+}$  — поступил ли он цитоплазму клетки из внеклеточной среды или из внутриклеточных депо. Концентрация цитоплазматического  $\text{Ca}^{2+}$  в сперматозоидах быков составляет от 50 до 200 нМ (Vijayaraghavan, Hoskins, 1989), тогда как константа диссоциации комплекса ХТЦ- $\text{Ca}^{2+}$  составляет около 400 мкМ, что делает ХТЦ нечувствительным к низким концентрациям  $\text{Ca}^{2+}$  и не способным к измерениям  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме клеток (Caswell, Hutchinson, 1971). В то же время

способность ХТЦ проникать через мембраны и накапливаться в местах скопления  $\text{Ca}^{2+}$  в высокой концентрации (внутриклеточные депо  $\text{Ca}^{2+}$ ) делает его использование удобным для изучения уровней  $\text{Ca}^{2+}$  в местах его высокой концентрации (Cerella et al., 2007).

Зависимость процессов капацитации и акросомной реакции от  $\text{Ca}^{2+}$  широко представлена в литературе, однако точные механизмы, с помощью которых  $\text{Ca}^{2+}$  мобилизуется в сперме млекопитающих, еще предстоит полностью установить.

Цель настоящего исследования — идентификация путей трансдукции кальция, мобилизованного из интрацитоплазматических депо сперматозоидов быков, в процессах капацитации и акросомной реакции.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах использовали сперматозоиды от разных быков, полученные непосредственно перед работой. В каждом опыте использовался эякулят спермы от трех быков голштинской породы. Освобождение спермы от семенной плазмы проводили центрифугированием при 300 g в течение 10 мин в среде TALP, содержащей 100 мМ NaCl, 3.1 мМ KCl, 25 мМ  $\text{NaHCO}_3$ , 0.3 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 21.6 мМ лактата натрия, 0.5 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 0.4 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 10 мМ HEPES, 1 мМ пирувата (Sigma, США). Для отмывания спермы к среде TALP добавляли поливинилалкоголь (молекулярной массой 30000–70000 Да) (Sigma, США) в концентрации 0.1%. Процедуру отмывания повторяли дважды.

Измерение  $\text{Ca}^{2+}$  во внутриклеточных депо проводили с помощью флуоресцентного зонда хлортетрациклин (ХТЦ) (Sigma, США), обеспечивающего при проведении представленных экспериментов вход ГТФ и ГДФ в сперматозоиды. В случае использования другого зонда для измерения кальция требовалась бы процедура пермеабиллизации для обеспечения входа в клетки ГТФ и ГДФ, в то время как ХТЦ способствовал входу в клетки ГТФ и ГДФ без дополнительных процедур (Денисенко, Кузьмина, 2005). Сперматозоиды инкубировали в присутствии ХТЦ в концентрации 100 мкМ в течение 30 мин при температуре 38.5°C, 95% влажности и 5%  $\text{CO}_2$ . После окрашивания клетки отмывали с помощью центрифугирования в среде TALP при 300 g в течение 10 мин. Процедуру повторяли три раза. Измерение интенсивности флуоресценции ХТЦ проводили на спектрофлуориметре (Hitachi, Япония) в среде TALP без добавления  $\text{CaCl}_2$ . Величина длин волн возбуждения и излучения для

ХТЦ равнялась 380 и 530 нм, соответственно. Содержание в сперматозоидах кальция внутриклеточных депо измеряли в условных единицах (усл. ед.) интенсивности флуоресценции комплекса  $\text{Ca}^{2+}$ -ХТЦ. Концентрация сперматозоидов при измерении составляла  $1.5 \times 10^6$  клеток/мл.

С целью активации процессов капацитации сперматозоиды быков инкубировали 4 ч при  $38.5^\circ\text{C}$ , 95% влажности и 5%  $\text{CO}_2$ . Для капацитации использовали среду Sp-TALP, в которую добавляли 6 мг/мл BSA и 0.5 мМ  $\text{CaCl}_2$ . Активацию акросомной реакции проводили с помощью лизофосфатидилхолина (Sigma, США) в концентрации 100 мкМ, который добавляли к предварительно капацитированным сперматозоидам (Parrish, 2014). Продолжительность акросомной реакции составляла 30 мин в условиях, аналогичных используемым для капацитации.

После прохождения капацитации или акросомной реакции из каждого экспериментального образца брали по 20 мкл суспензии сперматозоидов и 20 мкл раствора ХТЦ, смешивали и инкубировали при  $38.5^\circ\text{C}$  в течение 10 мин. Раствор ХТЦ (750 мкМ) готовили в буфере, который содержит 130 мМ NaCl, 5 мМ L-цистеина (Sigma, США) и 20 мМ Трис (pH 7.8) (Sigma, США). Раствор готовили ежедневно и хранили в темноте при  $4^\circ\text{C}$ . Затем в эту смесь для фиксации добавляли 10 мкл 25% глутаральдегида (Sigma, США) в 1 мМ Трисе (pH 7.4) до конечной концентрации 0.1%. В данной концентрации глутаральдегид обеспечивает стабильную флуоресценцию в течение 2 ч и не оказывает побочных эффектов на клетки (Ward, Storey, 1984). После этого при комнатной температуре каплю суспензии сперматозоидов (10 мкл) размещают на предметном стекле и смешивают с 10 мкл 0.22 М 1,4-дiazобисцикло [2.2.2]-октана (Sigma, США), растворенного в глицерол/PBS (9 : 1, v/v), для снижения выцветания флуоресценции. Образцы накрывают покровным стеклом и хранят в темноте при  $4^\circ\text{C}$ .

Оценку сперматозоидов проводили с использованием микроскопа ZEISS AxioLab. A1. (Zeiss, Германия) с фазовым контрастом и эпифлуоресцентной оптикой (возбуждение при 400–440 нм и излучение при 470 нм). Каждую из 200 клеток оценивали в соответствии с одним из трех типов флуоресценции ХТЦ (Fraser et al., 1995): равномерная флуоресценция во всей головке (некапацитированные клетки, образец F), свободная от флуоресценции полоса в постакросомальном районе (капацитированные клетки, образец B), и низкая флуоресценция во всей головке, за исключением тонкой яркой полосы флуоресценции в

экваториальном сегменте (акросома-реактивные клетки, образец AR).

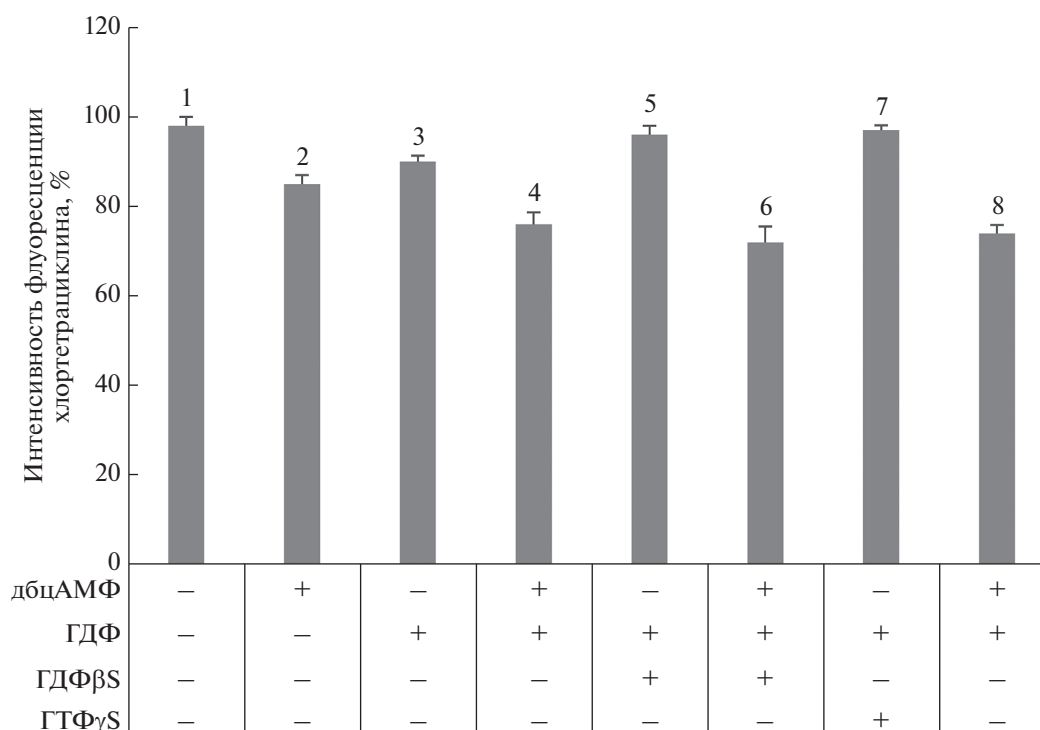
В работе использовали следующие реактивы: инкубационную среду TALP, ГДФβS, ГТФγS, ГТФ, ГДФ, дбцАМФ, пролактин, хлортетрациклин, ЭГТА (Sigma, США).

Достоверность различия сравниваемых средних значений для 4–5 независимых экспериментов оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Обработку данных проводили с помощью пакета статистической программы SigmaStat.

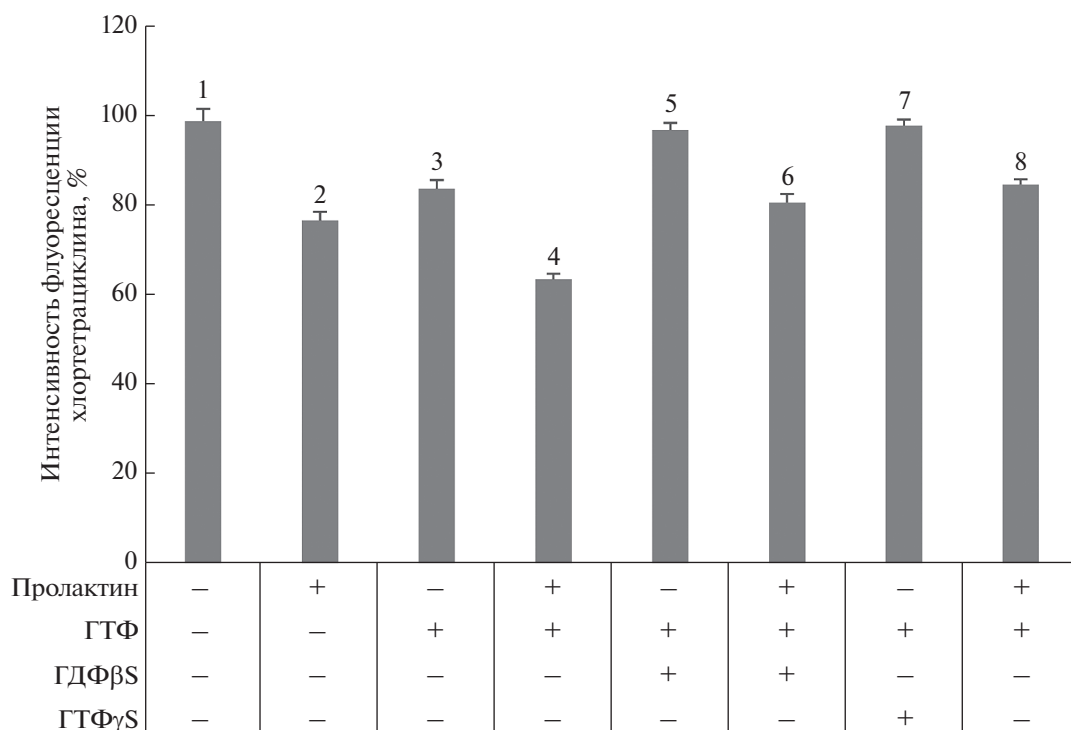
## РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты экспериментов, отражающие воздействие ГДФβS и ГТФγS на стимулированное дбцАМФ и ГДФ освобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо сперматозоидов быков представлены на рис. 1. В экспериментах использовали ГДФβS и ГТФγS в концентрациях 100 мкМ. Добавление дбцАМФ в концентрации 100 мкМ или ГДФ в концентрации 50 мкМ оказывало активирующий эффект на выход  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо сперматозоидов. Совместное действие дбцАМФ и ГДФ приводило к дополнительному освобождению  $\text{Ca}^{2+}$  из депо. Предварительная инкубация сперматозоидов в присутствии ГДФβS ингибировала освобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из депо, стимулированное добавлением ГДФ. Однако, на освобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо, активированное действием дбцАМФ, или дополнительный выход  $\text{Ca}^{2+}$  из депо, стимулированный совместным действием дбцАМФ и ГДФ, обработка клеток ГДФβS влияния не оказывала. Внесение в среду инкубации сперматозоидов ГТФγS приводило к ингибированию освобождения  $\text{Ca}^{2+}$  из депо, вызванного добавлением ГДФ. В то же время освобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо, стимулированное добавлением одного дбцАМФ, или совместным действием дбцАМФ и ГДФ, по-прежнему отмечалось даже в присутствии ГТФγS.

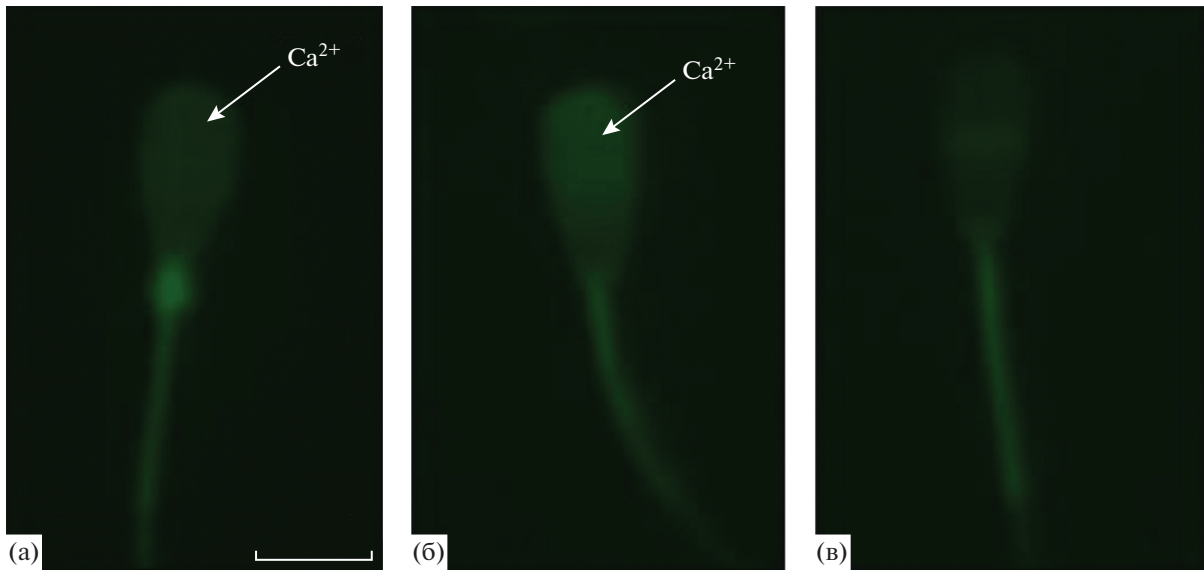
На рис. 2 представлены данные о влиянии ГДФβS и ГТФγS на стимулированное пролактином и ГТФ освобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо сперматозоидов быков. Выявлено, что добавление пролактина в концентрации 10 нг/мл или ГТФ в концентрации 10 мкМ активировало в клетках освобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо. При совместном действии пролактина и ГТФ в сперматозоидах отмечали дополнительный выход  $\text{Ca}^{2+}$  из депо. Инкубация сперматозоидов в присутствии ГДФβS в концентрации 100 мкМ оказывала ингибирующее влияние на освобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо при последующем



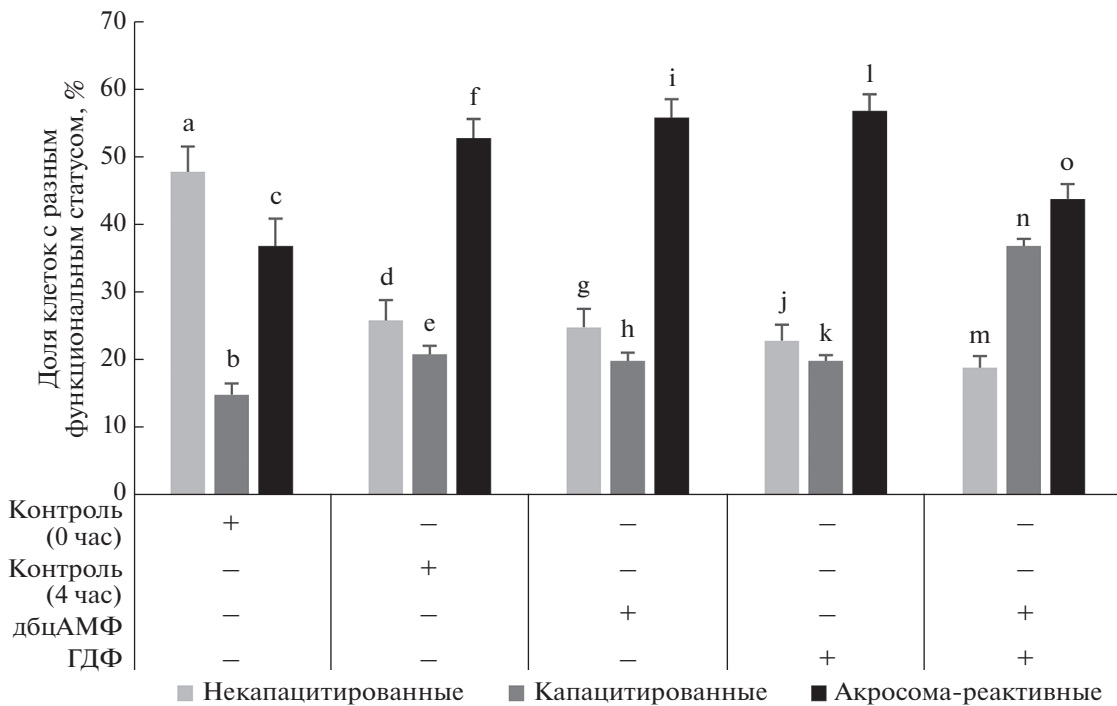
**Рис. 1.** Влияние ГДФβS и ГДФγS на стимулированное дбцАМФ и ГДФ освобождение  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо сперматозоидов быков. Концентрации ГДФβS и ГДФγS – 100 мкМ, дбцАМФ – 100 мкМ, ГДФ – 50 мкМ. По вертикали: интенсивность флуоресценции ХТЦ, %. Различия достоверны:  $P < 0.001$  (1 и 2; 2 и 8; 3 и 4; 3 и 5; 3 и 6; 3 и 7; 3 и 8; 5 и 6; 7 и 8),  $P < 0.01$  (1 и 3; 2 и 4; 2 и 6).



**Рис. 2.** Влияние ГДФβS и ГДФγS на стимулированное пролактином и ГДФ освобождение  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо сперматозоидов быков. Концентрации ГДФβS и ГДФγS – 100 мкМ, пролактин – 10 нг/мл, ГДФ – 10 мкМ. По вертикали: интенсивность флуоресценции ХТЦ, %. Различия достоверны:  $P < 0.001$  (1 и 3; 1 и 2; 2 и 4; 3 и 4; 3 и 5; 3 и 7).



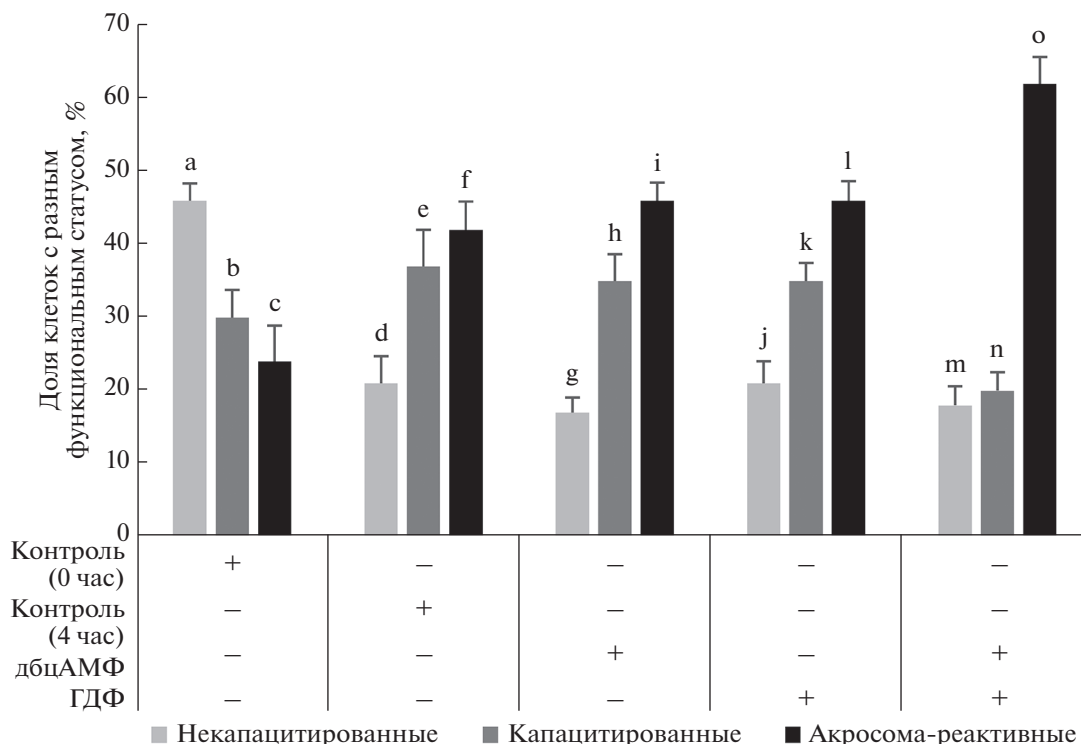
**Рис. 3.** Репрезентативные изображения образцов окрашивания сперматозоидов быков ХТЦ после инкубации в течение 4 ч в среде Sp-TALP и 6 мг/мл BSA: (а) образец F – некапацированные клетки, (б) – капацированные клетки, (в) AR – акросома-реактивные клетки; Ca<sup>2+</sup> – внутриклеточные депо кальция. Концентрация ХТЦ – 750 мкМ, для оценки использовали не менее 200 клеток. Длина волн возбуждения 400 нм, эмиссии – 470 нм. Стрелками указана локализация флуоресценции зонда отражающая изменения концентрации Ca<sup>2+</sup>. Объектив ×40. Размер масштабной линейки соответствует 7 мкм.



**Рис. 4.** Влияние дбцАМФ и ГДФ на капацитацию сперматозоидов быков. Концентрации дбцАМФ и ГДФ составляли 100 и 50 мкМ. По вертикали: доля клеток с разным функциональным статусом, %. Различия достоверны при  $P < 0.001$  (а и d; а и g; а и j; а и m; о и l; о и i; n и k; n и h; n и e).

добавлении ГТФ. В то же время на действие одного пролактина или на совместное действие пролактина и ГТФ предварительная обработка клеток

ГДФβS не оказывала воздействия. В присутствии ГДФβS пролактин по-прежнему стимулировал выход Ca<sup>2+</sup> из депо, а совместное действие пролактина



**Рис. 5.** Влияние пролактина и ГДФ на акросомную реакцию сперматозоидов быков. Концентрации пролактина и ГДФ составляли 10 нг/мл и 10 мкМ. По вертикали: доля клеток с разным функциональным статусом, %. Различия достоверны при  $P < 0.001$  (a и d; a и g; a и j; a и m; n и k; n и h),  $P < 0.01$  (o и l; o и i).

и ГДФ активировало дополнительное освобождение  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо. Предварительная инкубация сперматозоидов в присутствии ГДФγS приводила к ингибированию освобождения  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо, вызванного добавлением ГДФ. Использование для активации клеток одного пролактина, или совместное действие пролактина и ГДФ, стимулировали освобождение  $Ca^{2+}$  из депо при действии одного реагента, или дополнительное освобождение  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо при действии двух соединений даже в присутствии ГДФγS.

При анализе сперматозоидов, ранжированных в соответствии с их функциональным статусом (контрольные, капацитированные и акросома-реактивные клетки, рис. 3) использовали среду TALP с добавлением кальция в концентрации 0.5 мМ. На рис. 4 представлены данные о влиянии дбцАМФ и ГДФ на капацитацию сперматозоидов быков. После 4 ч инкубации в контрольных клетках в сравнении с контролем (0 ч инкубации) обнаружено снижение количества контрольных клеток (образец F) и увеличение числа акросомных клеток (образец AR). Совместное (в течение 4 ч) действие дбцАМФ и ГДФ вызывает значительное увеличение процентного содержания капацити-

рованных клеток (образец B), эффект отсутствовал при воздействии каждого из этих соединений в отдельности.

На рис. 5 представлены данные, отражающие эффекты пролактина и ГДФ на акросомную реакцию сперматозоидов. Инкубация контрольных клеток (4 ч) приводит к снижению количества контрольных клеток (образец F) и росту числа акросомных клеток (образец AR) в сравнении с клетками на 0 ч инкубации. После 4 ч инкубации сперматозоидов в присутствии пролактина и ГДФ отмечали значительное увеличение количества акросомных клеток (образец AR) и снижение числа капацитированных клеток (образец B), в сравнении с действием отдельно каждого из этих соединений.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В результате анализа данных, полученных в экспериментах, обнаружено, что добавление ГДФ или ГДФ к сперматозоидам быков стимулировало освобождение  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо. Ранее на клетках N1E-115 нейрональной клеточной линии было показано, что ГДФ стимулирует освобождение  $Ca^{2+}$  из внутриклеточного депо с задержкой

во времени, которая составляла примерно 90 с (Ueda et al., 1986). Фактически самостоятельно ГДФ не стимулирует освобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо; ГДФ $\beta\text{S}$ , который не фосфорилируется до ГТФ $\beta\text{S}$  с помощью нуклеозиддифосфокиназы, не активирует освобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо (Gill et al., 1988). Логично предположить, что эффект этого нуклеотида на освобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо может быть обусловлен его превращением в ГТФ через катализируемую реакцию фосфорилирования, стимулируемую в присутствии АТФ. Этот процесс превращения ГДФ в ГТФ опосредуется ферментом нуклеозиддифосфокиназа (Ueda et al., 1986). ГДФ $\beta\text{S}$  и ГТФ $\gamma\text{S}$  являются соединениями, которые не подвергаются реакции гидролиза. Отсутствие влияния ГТФ $\gamma\text{S}$  на освобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо и его ингибирующее действие на стимулированное ГТФ освобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из депо свидетельствуют о том, что для активации освобождения  $\text{Ca}^{2+}$  необходим гидролиз ГТФ.

Таким образом, в сперматозоидах быков добавленные отдельно ГТФ и ГДФ стимулируют выход  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо, причем для реализации воздействия ГТФ необходим его гидролиз, в то время как эффект ГДФ предположительно связан с переходом его в ГТФ и последующим гидролизом.

Если добавленные отдельно ГТФ или ГДФ не стимулируют освобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо в присутствии ГДФ $\beta\text{S}$  или ГТФ $\gamma\text{S}$ , то при совместном действии пролактина и ГТФ, а также дбцАМФ и ГДФ в сперматозоидах быков по-прежнему отмечается дополнительное освобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из депо в присутствии ГДФ $\beta\text{S}$  и ГТФ $\gamma\text{S}$ . Это позволяет предположить, что механизм действия на освобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо при воздействии одного ГТФ или ГДФ, и при участии этих нуклеотидов в совместном действии в присутствии пролактина или дбцАМФ, различен.

В большинстве клеток млекопитающих показано наличие двух типов внутриклеточных депо кальция — инозитолтрифосфат- и рианодин-чувствительных внутриклеточных депо (Berridge, 2002). Согласно гипотезе, выдвинутой Mullaney et al. и Ghosh с соавторами, ГТФ способствует образованию связи между различными внутриклеточными депо кальция ( $\text{IP}_3$ -чувствительными и  $\text{IP}_3$ -нечувствительными) и обеспечивает переход  $\text{Ca}^{2+}$  из  $\text{IP}_3$ -нечувствительных в  $\text{IP}_3$ -чувствительные внутриклеточные депо. Совместное действие

$\text{IP}_3$  и ГТФ способствует дополнительному освобождению  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо (Mullaney et al., 1987; Ghosh et al., 1989). В сперматозоидах млекопитающих присутствуют не менее двух различных органелл для хранения кальция, расположенных в акросомной части и области шейки (Costello et al., 2009). Для образования связи между различными внутриклеточными депо кальция необходимо, чтобы взаимодействующие соединения активировали освобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из различных внутриклеточных депо и одним из соединений должны быть ГТФ или ГДФ. Ранее на сперматозоидах быков нами было показано, что пролактин и ГДФ стимулируют выход  $\text{Ca}^{2+}$  из  $\text{IP}_3$ -чувствительных депо, а дбцАМФ (теофиллин) и ГТФ — из рианодин-чувствительных внутриклеточных депо кальция (Денисенко и др., 2015). Так как в сперматозоидах быков при совместном действии пролактина и ГТФ, а также дбцАМФ и ГДФ, присутствует дополнительное освобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо, можно предположить, что в данном случае действие ГТФ и ГДФ направлено на образование связи и обеспечение перехода  $\text{Ca}^{2+}$  между различными внутриклеточными депо.

Таким образом, из анализа результатов, полученных в наших экспериментах, следует, что, действуя отдельно, ГТФ или ГДФ стимулируют выход  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо, при совместном действии пролактина и ГТФ, а также дбцАМФ и ГДФ действие нуклеотидов, вероятно, направлено на образование связи и перемещение  $\text{Ca}^{2+}$  между различными внутриклеточными депо.

После завершения капацитации сперматозоиды приобретают способность подвергаться акросомной реакции, при которой происходит экзоцитоз акросомных пузырьков. Связывание сперматозоида с одним из гликопротеинов зоны пеллюцида ооцита стимулировало вход  $\text{Ca}^{2+}$  и акросомную реакцию в сперматозоидах млекопитающих (Abou-Naila et al., 2014). Сперматозоиды человека обладают внутриклеточными депо  $\text{Ca}^{2+}$  и освобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из этих депо, стимулированное тапсигаргином, активирует вход  $\text{Ca}^{2+}$  из внешней среды, который регулирует важные биологические процессы, являющиеся фундаментальными для акросомной реакции (Sosa et al., 2016; Engel et al., 2018). В сперматозоидах быков увеличение количества клеток на стадии акросомной реакции происходило при одновременном использовании для активации сперматозоидов пролактина и ГТФ. В этом случае действие ГТФ направлено на образование связи и обеспечение перехода  $\text{Ca}^{2+}$  между

различными (IP<sub>3</sub>- и рианодинчувствительными) внутриклеточными депо.

В процессах капацитации участвует как внутриклеточный, так и внеклеточный кальций. Инкубация сперматозоидов свиней в бескальциевой среде приводила к ингибированию капацитации, что свидетельствует о необходимости внеклеточного Ca<sup>2+</sup> для активации процессов капацитации (Martinez-Abad et al., 2017). Также было обнаружено увеличение концентрации внутриклеточного кальция во время прохождения этого процесса (Lopez-Torres et al., 2017). В сперматозоидах быков рост числа клеток на стадии капацитации наблюдали в случае совместного использования дбцАМФ и ГДФ. Вероятно, в данном случае действие ГДФ, также как и ГТФ, направлено на образование связи между различными внутриклеточными депо кальция.

На основании результатов экспериментов предлагается гипотеза, согласно которой капацитация и акросомная реакция в сперматозоидах быков происходит вследствие перемещения Ca<sup>2+</sup> между различными внутриклеточными депо при воздействии дбцАМФ, пролактина, ГТФ и ГДФ, причем стимулированное совместным действием дбцАМФ и ГДФ перемещение кальция приводит к увеличению количества капацитированных клеток, тогда как рост числа сперматозоидов на стадии акросомной реакции отмечали при воздействии на мужские гаметы пролактина и ГТФ.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки (Госзадание № АААА-А18-118021590132-9).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы использования животных в экспериментах и условия ухода за ними были соблюдены.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

#### ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Авторы В.Ю. Денисенко и Т.И. Кузьмина внесли одинаковый вклад в данное исследование и подготовку статьи.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Денисенко В.Ю., Кузьмина Т.И. Эффект гуаниновых нуклеотидов и протеинкиназы С на стимулированное пролактином освобождение Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных депо ооцитов свиней. *Онтогенез*. 2005. Т. 36. № 3. С. 1–6. (Denisenko V.Yu., Kuzmina T.I. Effects of guanine nucleotides and protein kinase C on prolactin-stimulated release of Ca<sup>2+</sup> from intracellular stores of pig oocytes // *Rus. J. Devel. Biol.* 2005. V. 36. № 3. P. 161–165.)
- Денисенко В.Ю., Бойцева Е.Н., Кузьмина Т.И. Освобождение Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных депо сперматозоидов *Bos Taurus* в зависимости от их функционального состояния // *Цитология*. 2015. Т. 57. № 3. С. 233–239.
- Abou-Haila A., Bendahmane M., Tulsiani D.R. Significance of egg's zona pellucida glycoproteins in sperm-egg interaction and fertilization // *Minerva. Ginecol.* 2014. V. 66. № 4. P. 409–419.
- Almadaly E., Hoshino Y., Ueta T. et al. Desalted and lyophilized bovine seminal plasma delays induction of the reaction in frozen-thawed bovine spermatozoa in response to calcium ionophore // *Theriogen.* 2015. V. 83. № 2. P. 175–185.
- Battistone M.A., Da Ros V.G., Salicioni A.M. et al. Functional human sperm capacitation requires both bicarbonate-dependent PKA activation and down-regulation of Ser/Thr phosphatases by Src family kinases // *Mol. Hum. Reprod.* 2013. V. 19. № 9. P. 570–580.
- Berridge M.J. The negative feedback by protein kinase C // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 268. P. 8425–8428.
- Brouwers J.F., Boerke A., Silva P.F. et al. Mass spectrometric detection of cholesterol oxidation in bovine sperm // *Biol. Reprod.* 2011. V. 85. № 1. P. 128–136.
- Buffone M.G., Wertheimer E.V., Visconti P.E. et al. Central role of soluble adenylyl cyclase and cAMP in sperm physiology // *Biochim. Biophys. Acta.* 2014. V. 1842. № 12. P. 2610–2620.
- Caswell A.H., Hutchinson J.D. Selectivity of cation chelation to tetracyclines: Evidence for special conformation of calcium chelate // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1971. V. 43. № 3. P. 625–630.
- Cerella C., Mearelli C., DeNicola M., Dalessio M., Magrini A., bergamaschi A., Ghibelli L. Analysis of calcium changes in endoplasmic reticulum during apoptosis by the fluorescent indicator chlortetracycline // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2007. V. 1099. P. 490–493.
- Costello S., Michelangeli F., Nash K. et al. Ca<sup>2+</sup>-stores in sperm: their identities and functions // *Reprod.* 2009. V. 138. № 3. P. 425–437.
- Darszon A., Nishigaki T., Wood C. et al. Calcium channels and Ca<sup>2+</sup> fluctuations in sperm physiology // *Int. Rev. Cytol.* 2005. V. 243. P. 79–172.
- Engel K.M., Springsguth C.H., Grunewald S. What happens to the unsuccessful spermatozoa // *Androl.* 2018. V. 6. № 2. P. 1–10.



- Florman H.M., Jungnickel M.K., Sutton K.A. Regulating the acrosome reaction // *Int. J. Dev. Biol.* 2008. V. 52. № 5–6. P. 503–510.
- Fraser L.R., Abeydeera L.R., Niwa K. Ca<sup>2+</sup>-regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis // *Mol. Reprod. Dev.* 1995. V. 40. № 2. P. 233–241.
- Gadella B.M., Boerke A. An update on post-ejaculatory remodeling of the sperm surface before mammalian fertilization // *Theriogen.* 2016. V. 85. № 1. P. 113–124.
- 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.
- Gill D.L., Mullaney J.M., Ghosh T.K. Intracellular calcium translocation: mechanism of activation by guanine nucleotides and inositol phosphates // *J. Exp. Biol.* 1988. V. 139. P. 105–133.
- Halet G. Monitoring calcium oscillations in fertilized mouse eggs // *Methods Mol. Biol.* 2016. V. 1457. P. 231–240.
- Harayama H. Roles of intracellular cyclic AMP signal transduction in the capacitation and subsequent hyperactivation of mouse and boar spermatozoa // *J. Reprod. Dev.* 2013. V. 59. № 5. P. 421–430.
- Harrison R.A.P., Gadella B.M. Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation // *Theriogen.* 2005. V. 63. № 2. P. 342–351.
- Herrick S.B., Schweissinger D.L., Kim S.W. et al. The acrosomal vesicle of mouse sperm is a calcium store // *J. Cell. Physiol.* 2005. V. 202. № 3. P. 663–671.
- Jimenez-Gonzalez C., Michelangeli F., Harper C.V. et al. Calcium signaling in human spermatozoa: a specialized toolkit of channels, transporters and stores // *Hum. Reprod. Update.* 2006. V. 12. № 3. P. 253–267.
- Lawson C., Goupil S., Leclerc P. Increased activity of the human sperm tyrosine kinase SRC by the cAMP-dependent pathway in the presence of calcium // *Biol. Reprod.* 2008. V. 79. № 4. P. 657–666.
- Lopez-Torres A.S., Gonzalez-Gonzalez M.E., Mata-Martinez E. et al. Luteinizing hormone modulates intracellular calcium, protein tyrosine phosphorylation and motility during human sperm capacitation // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017. V. 483. № 2. P. 834–839.
- Martinez-Abad S., Castillo-Martin M., Gadani B. et al. Voltage-dependent anion channel 2 is involved in in vitro capacitation of boar sperm // *Reprod. Domest. Anim.* 2017. V. 52. № 4. P. 65–68.
- 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. № 28. P. 13865–13872.
- Parrish J.J. Bovine in vitro fertilization: in vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin // *Theriogen.* 2014. V. 81. № 1. P. 67–73.
- Pons-Rejraji H., Bailey J.L., Leclerc P. Modulation of bovine sperm signalling pathways: correlation between intracellular parameters and sperm capacitation and acrosome exocytosis // *Reprod. Fertil. Dev.* 2009. V. 21. № 4. P. 511–524.
- Rodriguez P.C., Satorre M.M., Beconi M.T. Effect of two intracellular calcium modulators on sperm motility and heparin-induced capacitation in cryopreserved bovine spermatozoa // *Anim. Reprod. Sci.* 2012. V. 131. № 3–4. P. 135–142.
- Sosa C.M., Zanetti M.N., Pocognoni C.A. et al. Acrosomal swelling is triggered by cAMP downstream of the opening of store-operated calcium channels during acrosomal exocytosis in human sperm // *Biol. Reprod.* 2016. V. 94. № 3. P. 57–61.
- Tsien R.Y., Pozzan T., Rink T.J. Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator // *J. Cell Biol.* 1982. V. 94. № 2. P. 325–334.
- Ueda T., Chueh S.H., Noel M.W. et al. Influence of inositol 1,4,5-trisphosphate and guanine nucleotides on intracellular calcium release within the N1E-115 neuronal cell line // *J. Biol. Chem.* 1986. V. 261. P. 3184–3192.
- Vijayaraghavan S., Hoskins D. Quantitation of bovine sperm cytoplasmic calcium with Quin-2 and Fura-2: evidence that external calcium does not have direct access to the sperm cytoplasm // *Cell Calcium.* 1989. V. 10. № 4. P. 241–253.
- 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. № 2. P. 287–296.

## Intracytoplasmic Calcium Transduction in *Bos taurus* Spermatozoa at Capacitation and Acrosome Reaction

V. Yu. Denisenko<sup>1</sup> and T. I. Kuzmina<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup>All-Russian Research Institute of Genetics and Breeding of Farm Animals – Branch of Federal Science Center for Animal Husbandry named after Academy Member L.K. Ernst, Moskovskoye shosse, 55a, St. Petersburg – Pushkin, Moscow, 196601 Russia

\*e-mail: prof.kouzmina@mail.ru

Fluorescence intensity indicators of the membrane-calcium-chlortetracycline complex in bovine spermatozoa in the process of capacitation and acrosome reaction using an inhibitor analysis were monitored. It was revealed that the addition of separately prolactin, dbcAMP, GTP, or GDP stimulated the release of Ca<sup>2+</sup> from

intracellular stores (ICS) in spermatozoa. With the combined action of prolactin and GTP, as well as dbcAMP and GDP, an additional release of  $\text{Ca}^{2+}$  from ICS was detected. Pre-incubation in the presence of non-hydrolyzable  $\text{GDP}\beta\text{S}$  or  $\text{GTP}\gamma\text{S}$  inhibited  $\text{Ca}^{2+}$  release from intracellular depots stimulated by GTP or GDP but did not affect prolactin or dbcAMP-activated  $\text{Ca}^{2+}$  release from ICS. At the same time, with the combined action of prolactin and GTP, as well as dbcAMP and GDP, an additional  $\text{Ca}^{2+}$  output from ICS previously incubated in the presence of  $\text{GDP}\beta\text{S}$  or  $\text{GTP}\gamma\text{S}$  is still present. An analysis of the localization of chlortetracycline fluorescence in spermatozoa revealed that after incubation of spermatozoa in the presence of dbcAMP, GDP or their combined effect the largest number of capacitated cells was recorded under the combined action of these two compounds. Incubation of cells with the addition of prolactin, GTP, or their combined action led to an increase in the number of acrosomal cells, with the greatest number being recorded after the combined action of prolactin and GTP. Thus, it is reasonable to assume that the mobilization of calcium from intracellular stores determines the increase in the number of capacitated bull sperm, the effect is most pronounced with the combined action of dbcAMP and GDP, and the increase in the number of acrosomal cells, the maximum number of which was revealed by the combined action of prolactin and GTP.

*Keywords:* capacitation, acrosome reaction, calcium, bull sperm