

ОСВОБОЖДЕНИЕ Ca^{2+} ИЗ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ДЕПО СПЕРМАТОЗОИДОВ *BOS TAURUS* В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИХ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ

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

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных РАСХН, Санкт-Петербург—Пушкин;
электронный адрес: prof.kouzmina@mail.ru

На основе ингибиторного анализа с помощью хлортетрациклинового флуоресцентного зонда (ХТЦ) изучены пути трансдукции кальция в сперматозоидах *Bos taurus*. При совместном действии пролактина и ГТФ отмечали дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо сперматозоидов, которое присутствовало при воздействии ингибитора протеинкиназы С (соединение Ro 31-8220); совместное действие теofilлина и ГДФ также стимулировало дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо, отсутствующее при добавлении ингибитора протеинкиназы А соединения Н-89. С использованием ХТЦ-теста (анализ локализации флуоресценции ХТЦ в сперматозоидах) показано, что при совместном действии пролактина и ГТФ увеличивается количество сперматозоидов на стадии акросомной реакции, которое снижается после использования Ro 31-8220; совместное действие теofilлина и ГДФ увеличивает долю капацитированных сперматозоидов, уменьшающуюся в присутствии Н-89. В соответствии с полученными данными предлагается гипотеза, согласно которой перемещение Ca^{2+} между внутриклеточными депо сперматозоидов быков, стимулированное совместным действием пролактина и ГТФ или теofilлина и ГДФ, детерминирует функциональный статус сперматозоида. Трансдукция Ca^{2+} между внутриклеточными депо сперматозоидов быков, стимулированная совместным действием пролактина и ГТФ, участвует в регуляции акросомальных процессов, в то время как капацитация сперматозоидов опосредуется активированным воздействием теofilлина и ГДФ перемещением кальция между внутриклеточными депо.

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

Принятые сокращения: ХТЦ — хлортетрациклин, IP_3 — инозитол-1,4,5-трифосфат.

Капацитация и акросомная реакция являются важными внутриклеточными событиями, предшествующими процессу оплодотворения. Капацитация является достаточно сложным явлением, которое осуществляется в женских половых путях. В результате биофизических и биохимических изменений, которые происходят в сперматозоидах и их мембранах во время капацитации, мужские гаметы приобретают способность проникать в яйцеклетку (White, Aitken, 1989; Harrison, Miller, 2000). Изменения в плазматических мембранах сперматозоидов, такие как снижение содержания холестерина, стимулируют пути кальциевой сигнализации, которые детерминируют капацитацию (Visconti et al., 1999). Полагают, что эти мембранные изменения способствуют увеличению проницаемости для таких ионов, как Ca^{2+} и HCO_3^- , которые входят в цитоплазму и стимулируют аденилилциклазу, активирующую образование цАМФ, что приводит к стимуляции протеинкиназы А и в конечном счете — фосфорилированию белка тирозина (Chen et al., 2000). Установлено, что кальциевый сигнал играет ключевую роль в физиологии сперматозоидов, принимая непосредственное участие в регуляции различных функций этих клеток (Felix, 2005). В мембранах мужских гамет присутствуют потенциал-чувствительные Ca^{2+} -каналы L-типа, аналогичные ка-

налам соматических клеток (Florman et al., 1992). В естественных условиях (in vivo) акросомная реакция начинается при связывании сперматозоида с блестящей оболочкой (zona pellucida) яйцеклетки, и только сперматозоид, завершивший акросомную реакцию, может проникнуть в яйцеклетку (Wassarman et al., 2001). В сперматозоидах мышей мобилизации кальция из акросомных депо оказалось достаточно для активации акросомной реакции даже в условиях отсутствия внеклеточного Ca^{2+} и присутствия ЭГТА (Herrick et al., 2005). В мужских гаметах млекопитающих присутствуют не меньше двух различных внутриклеточных органелл для хранения кальция, расположенных в акросомной части и области шейки (Costello et al., 2009). В мембране акросомной части сперматозоидов было показано присутствие компонентов фосфоинозитидной сигнальной системы. Фосфолипаза С, которая стимулирует образование инозитол-1,4,5-трифосфата (IP_3), обнаружена в передней части головки сперматозоидов (Walensky, Snyder, 1995). Присутствие рецепторов к рианодину было показано на зрелых сперматозоидах грызунов (Trevino et al., 1998). Мобилизация Ca^{2+} из акросомы и внутриклеточных депо в районе шейки регулирует разные внутриклеточные функции. У млекопитающих акросомная реакция, как полагают, проис-

ходит на поверхности блестящей оболочки. Взаимодействие сперматозоида с блестящей оболочкой активирует каскады сигнализации, ведущие к акросомному экзоцитозу (Florman et al., 2008). В сперматозоидах человека, стимулированных прогестероном, увеличение колебаний кальция в шейке и, как следствие, регулирование деятельности жгутиков не вызывают детектируемого увеличения акросомной реакции (Harper et al., 2004).

Цель настоящего исследования — на основе ингибиторного анализа с помощью хлортетрациклинового флуоресцентного зонда (ХТЦ) исследовать пути перемещения кальция между различными внутриклеточными депо (IP_3 -чувствительными и IP_3 -нечувствительными) в сперматозоидах *Bos taurus* в зависимости от их функционального статуса (капацитация, акросомная реакция).

Материал и методика

В экспериментах использовали эякуляты спермы от трех разных быков, полученные непосредственно перед работой. Для освобождения от семенной плазмы сперму отмывали центрифугированием при $300 \times g$ в течение 10 мин в среде TALP, содержащей 100 мМ NaCl, 3.1 мМ KCl, 25 мМ $NaHCO_3$, 0.3 мМ NaN_2PO_4 , 21.6 мМ лактата натрия, 2 мМ $CaCl_2$, 0.4 мМ $MgCl_2$, 10 мМ HEPES и 1 мМ пирувата. Для отмывания спермы к среде TALP добавляли поливинилалкоголь (мол. масса 30 000—70 000 Да) (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 0.1 %. Процедуру отмывания клеток повторяли 2 раза.

Измерение Ca^{2+} во внутриклеточных депо проводили с помощью флуоресцентного зонда ХТЦ (Sigma-Aldrich, США). У этого зонда в наших экспериментах также была вторая функция — он обеспечивал вход ГТФ (Sigma-Aldrich, США) и ГДФ (Sigma-Aldrich, США) в сперматозоиды. Использование другого зонда требовало бы дополнительной процедуры пермеабиллизации клеток для обеспечения входа в клетки ГТФ и ГДФ, тогда как ХТЦ был способен обеспечить вход ГТФ и ГДФ в клетки без каких-либо дополнительных процедур (Денисенко, Кузьмина, 2005). Измерение Ca^{2+} проводили в среде Sp-TALP, в которую вместо поливинилалкоголя добавляли BSA (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 1 мг/мл. Сперматозоиды инкубировали в присутствии ХТЦ в концентрации 200 мкМ в течение 30 мин при $38.5^\circ C$, 95 % влажности и 5 % CO_2 . После окрашивания клетки отмывали с помощью центрифугирования при $300 \times g$ в течение 10 мин. Процедуру повторяли 3 раза. Измерение интенсивности флуоресценции кальция внутриклеточных депо проводили на спектрофлуориметре Hitachi. 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 Ca^{2+} —ХТЦ. Концентрация сперматозоидов при измерении составляла 1.5×10^6 кл./мл.

Капацитация сперматозоидов продолжалась 4 ч при $38.5^\circ C$, 95 % влажности и 5 % CO_2 . Для капацитации использовали среду Sp-TALP, в которую добавляли 6 мг/мл BSA и 0.5 мМ $CaCl_2$ (Sigma-Aldrich, США). Активацию акросомной реакции производили с помощью лизофосфатидилхолина (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 100 мкМ, который добавляли к предварительно капацитированным сперматозоидам (Parrish et al., 1988). Продолжительность акросомной реакции в присутствии ли-

зофосфатидилхолина составляла 30 мин при 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 $38.5^\circ C$ в течение 10 мин.

Раствор ХТЦ (750 мкМ) готовили в буфере, содержащем 130 мМ NaCl, 5 мМ L-цистеина (Sigma-Aldrich, США) и 20 мМ Трис (pH 7.8) (Sigma-Aldrich, США). Этот раствор готовили ежедневно и хранили при $4^\circ C$ в темноте. Затем в эту смесь для фиксации добавляли 10 мкл 25 % глутаральдегида в 1 мМ Трис (pH 7.4) (Sigma-Aldrich, США) до конечной концентрации 0.1 %. Глутаральдегид в этой концентрации делает флуоресценцию стабильной в течение 2 ч и не оказывает дополнительного влияния на клетки (Ward, Storey, 1984). После этого при комнатной температуре каплю суспензии сперматозоидов (10 мкл) размещали на предметном стекле и смешивали с 10 мкл 0.22 М 1,4-дiazобисцикло[2.2.2]-октана (Sigma-Aldrich, США), растворенного в глицерол/PBS (9 : 1), для того чтобы замедлить выцветание флуоресценции. Сверху капли накладывали покровное стекло и аккуратно сжимали стекла между слоями фильтровальной бумаги. Это позволяет удалить остатки лишней жидкости и расположить сперматозоиды на стекле в положении, способствующем их точной оценке. Затем для закрепления покровного стекла на его края наносили капли бесцветного лака для ногтей. Готовые препараты хранили в светонепроницаемом контейнере в холодильнике. Хотя препараты сохраняют флуоресценцию в течение 4—5 сут, преимущественно их оценивали в тот же или на следующий день.

Оценку сперматозоидов проводили с использованием микроскопа Zeiss 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 всей головки, что характерно для некапацитированных клеток с неповрежденной акросомой (образец F), наличие свободной от флуоресценции полосы в постакросомальном районе, что типично для капацитированных клеток с неповрежденной акросомой (образец B), отсутствие флуоресценции во всей головке, за исключением тонкой яркой полосы флуоресценции в экваториальном сегменте, что характерно для капацитированных акросома-реактивных клеток (образец AR).

В работе использовали следующие реактивы: инкубационную среду TALP, поливинилалкоголь, ХТЦ, BSA, лизофосфатидилхолин, глутаральдегид, L-цистеин, 1,4-дiazобисцикло[2.2.2]-октан, глицерол, PBS, ЭГТА, теofilлин, ГТФ, ГДФ, ингибитор протеинкиназы C Ro 31-8220, ингибитор протеинкиназы A H-89 (Sigma-Aldrich, США) и пролактин (Институт эндокринологии, Россия).

Достоверность различия сравниваемых средних значений для 4—5 независимых экспериментов оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента.

Результаты

Для измерения кальция во внутриклеточных депо в экспериментах использовали среду TALP без кальция, с добавлением 1 мг/мл BSA и 0.5 мМ ЭГТА (Sigma-Aldrich,

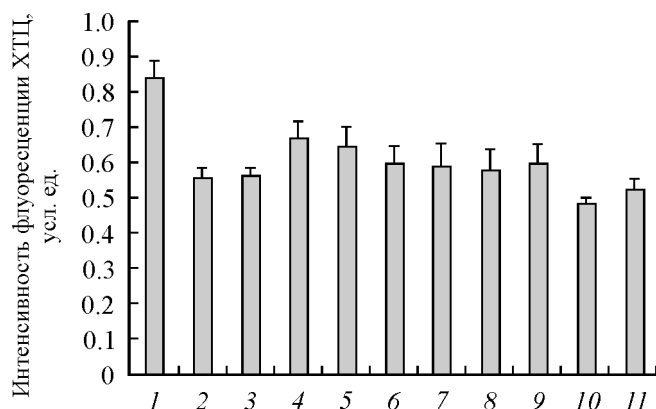


Рис. 1. Влияние теofilлина, пролактина и гуаниновых нуклеотидов (ГТФ и ГДФ) на освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо сперматозоидов быков.

По горизонтали: 1 — контрольные клетки, 2 — действие пролактина в концентрации 10 нг/мл, 3 — действие ГТФ в концентрации 10 мкМ, 4 — действие теofilлина в концентрации 1 мМ, 5 — действие ГДФ в концентрации 50 мкМ, 6 — совместное действие теofilлина и ГТФ, 7 — совместное действие ГТФ и ГДФ, 8 — совместное действие пролактина и ГДФ, 9 — совместное действие пролактина и теofilлина, 10 — совместное действие пролактина и ГТФ, 11 — совместное действие теofilлина и ГДФ. По вертикали — интенсивность флуоресценции ХТЦ, усл. ед. Вертикальные отрезки — стандартные ошибки средних значений. Различия достоверны при $P < 0.05$ (1 и 2, 1 и 3, 1 и 4, 1 и 5, 2 и 10, 3 и 10, 4 и 11, 5 и 11).

США). На рис. 1 представлены результаты оценки влияния теofilлина, пролактина и гуаниновых нуклеотидов (ГТФ и ГДФ) на освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо сперматозоидов быков. Добавление теofilлина в концентрации 1 мМ, пролактина в концентрации 10 нг/мл, а также ГТФ и ГДФ в концентрациях 10 и 50 мкМ соответственно стимулировало освобождение Ca^{2+} . При совместном действии теofilлина и ГТФ, ГТФ и ГДФ, пролактина и ГДФ, а также пролактина и теofilлина в клетках не отмечали дополнительного выхода Ca^{2+} из внутриклеточных депо. В то же время при совместном действии пролактина и ГТФ, а также теofilлина и ГДФ было зарегистрировано дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо сперматозоидов.

Данные о влиянии ингибитора протеинкиназы С на стимулированное пролактином и ГТФ освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо сперматозоидов отражены на рис. 2. Ингибитор протеинкиназы С соединение Ro 31-8220 использовали в экспериментах в концентрации 10 нг/мл. Воздействие пролактина в концентрации 10 нг/мл или ГТФ в концентрации 10 мкМ активировало освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо. При совместном действии пролактина и ГТФ в клетках отмечали дополнительный выход Ca^{2+} из депо. После обработки сперматозоидов соединением Ro 31-8220 в клетках не зарегистрировано изменений в содержании мембранно-связанного кальция. Добавление в инкубационную среду пролактина или ГТФ стимулировало освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо клеток, предварительно обработанных ингибитором протеинкиназы С. В то же время при совместном действии пролактина и ГТФ в присутствии Ro 31-8220 не отмечали дополнительного выхода Ca^{2+} из внутриклеточных депо сперматозоидов.

Влияние ингибитора протеинкиназы А соединения Н-89 на стимулированное теofilлином и ГДФ освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо сперматозоидов представлено на рис. 3. Обнаружено, что добавление

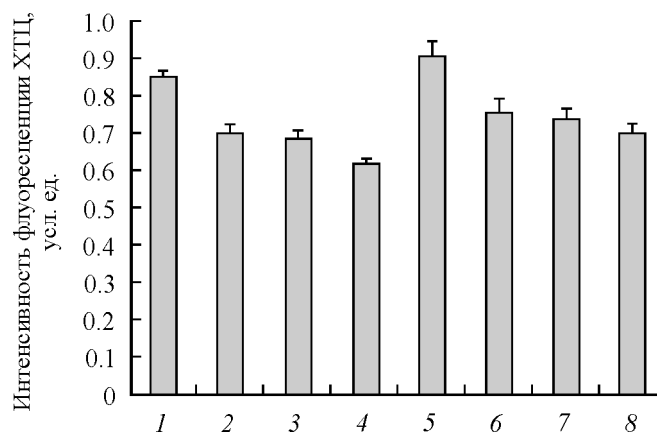


Рис. 2. Влияние ингибитора протеинкиназы С (Ro 31-8220) на стимулированное пролактином (ПРЛ) и ГТФ освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо сперматозоидов быков.

По горизонтали: 1 — контрольные клетки, 2 — действие ПРЛ в концентрации 10 нг/мл, 3 — действие ГТФ в концентрации 10 мкМ, 4 — совместное действие ПРЛ и ГТФ, 5 — действие Ro 31-8220 в концентрации 10 нг/мл, 6 — действие Ro 31-8220 с последующей обработкой ПРЛ, 7 — действие Ro 31-8220 с последующей обработкой ГТФ, 8 — действие Ro 31-8220 в концентрации 10 нг/мл с последующей совместной обработкой ПРЛ и ГТФ. По вертикали — интенсивность флуоресценции ХТЦ, усл. ед. Вертикальные отрезки — стандартные ошибки средних значений. Различия достоверны при $P < 0.01$ (4 и 8, 5 и 6), $P < 0.05$ (1 и 2, 1 и 3, 2 и 4, 3 и 4, 5 и 7).

только теofilлина в концентрации 1 мМ или только ГДФ в концентрации 50 мкМ активирует освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо. При совместном действии теofilлина и ГДФ отмечали дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Обработка сперматозоидов ингибитором протеинкиназы А в концентрации 10 мкМ не оказывала влияния на содержание Ca^{2+} во внутриклеточных депо. Добавление теofilлина или ГДФ к обработанным соединением Н-89 клеткам по-прежнему стимулировало освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных

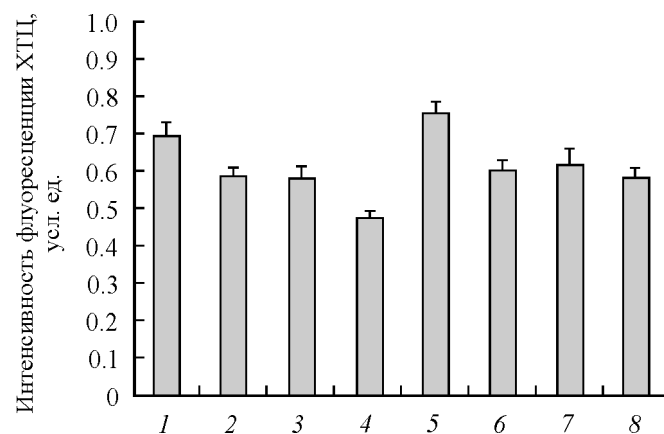


Рис. 3. Влияние ингибитора протеинкиназы А (Н-89) на стимулированное теofilлином и ГДФ освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо сперматозоидов быков.

По горизонтали: 1 — контрольные клетки, 2 — действие теofilлина в концентрации 1 мМ, 3 — действие ГДФ в концентрации 50 мкМ, 4 — совместное действие теofilлина и ГДФ, 5 — действие Н-89 в концентрации 10 мкМ, 6 — действие Н-89 с последующей обработкой теofilлином, 7 — действие Н-89 с последующей обработкой ГДФ, 8 — действие Н-89 в концентрации 10 мкМ с последующей обработкой теofilлином и ГДФ. По вертикали — интенсивность флуоресценции ХТЦ, усл. ед. Вертикальные отрезки — стандартные ошибки средних значений. Различия достоверны при $P < 0.01$ (2 и 4, 3 и 4, 4 и 8), $P < 0.05$ (1 и 2, 1 и 3).

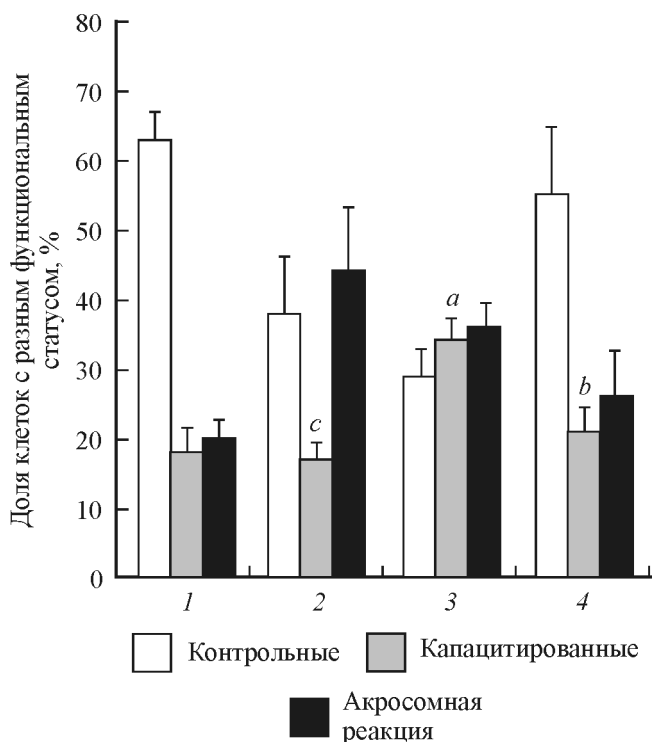


Рис. 4. Влияние теofilлина и ГДФ на капацитацию сперматозоидов быков.

По горизонтали: 1 — контрольные клетки (0 ч инкубации), 2 — контрольные клетки (4 ч инкубации), 3 — совместное действие теofilлина и ГДФ соответственно в концентрации 100 мкМ, 4 — обработка ингибитором протеинкиназы А соединением Н-89 в концентрации 10 мкМ с последующим совместным действием теofilлина и ГДФ. По вертикали — процентное содержание клеток с разным функциональным статусом. Вертикальные отрезки — стандартные ошибки средних значений. Различия достоверны при $P < 0.01$ (a, b) и $P < 0.001$ (a, c).

депо. В то же время при совместном действии теofilлина и ГДФ ингибитор протеинкиназы А оказывал негативное влияние на дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо.

ГТФ и ГДФ самостоятельно не способны проникать внутрь клеток в связи с отсутствием соответствующих рецепторов на поверхности клеток. В наших экспериментах вход ГТФ и ГДФ в сперматозоиды обеспечивали использованием ХТЦ, который способствует проникновению этих соединений в клетки (Денисенко, Кузьмина, 2005). Для этого клетки предварительно обрабатывали ХТЦ в концентрации 20 мкМ в течение 30 мин. При анализе сперматозоидов с учетом их функционального статуса (контрольные, капацитированные и акросома-реактивные клетки) использовали среду TALP с добавлением кальция в концентрации 0.5 мМ. На рис. 4 представлены данные о влиянии ингибитора протеинкиназы А соединения Н-89 на капацитацию сперматозоидов быков, стимулированную совместным действием теofilлина и ГДФ. Используемая в экспериментах концентрация Н-89 составляла 10 мкМ, теofilлина и ГДФ — 100 мкМ. После 4 ч инкубации в контрольном образце в сравнении с контролем (0 ч) отмечали снижение процентного содержания контрольных клеток (образец F) и увеличение процентного содержания акросомных клеток (образец AR). Совместное (в течение 4 ч) действие теofilлина и ГДФ вызывает значительное увеличение процентного содержания капацитированных клеток (образец B). Воздействие ин-

гибитора Н-89 на сперматозоиды, инкубированные в присутствии теofilлина и ГДФ, приводило к снижению количества капацитированных (образец B) и увеличению контрольных (образец F) клеток.

Активацию акросомной реакции после воздействия лизофосфатидилхолина изучали на сперматозоидах быков, инкубированных в присутствии пролактина и ГТФ (рис. 5). Для этого использовали капацитированные сперматозоиды, которые предварительно инкубировали в течение 4 ч. Обнаружено, что в контрольном образце через 4 ч инкубации в сравнении с контролем (0 ч) уменьшается процентное содержание контрольных клеток (образец F) и увеличивается процентное содержание акросома-реактивных клеток (образец AR). При совместном действии пролактина и ГТФ отмечается снижение доли капацитированных клеток (образец B) и увеличение количества акросома-реактивных сперматозоидов (образец AR). Добавление ингибитора протеинкиназы С соединения Ro 31-8220 изменяло совместный эффект пролактина и ГТФ на обратный: в этих условиях происходило увеличение количества капацитированных клеток (образец B) и уменьшение количества акросома-реактивных клеток (образец AR).

Обсуждение

Сравнительно недавно исследователи полагали, что увеличение концентрации цитозольного Ca^{2+} в сперматозоидах связано только с входом в эти клетки внеклеточ-

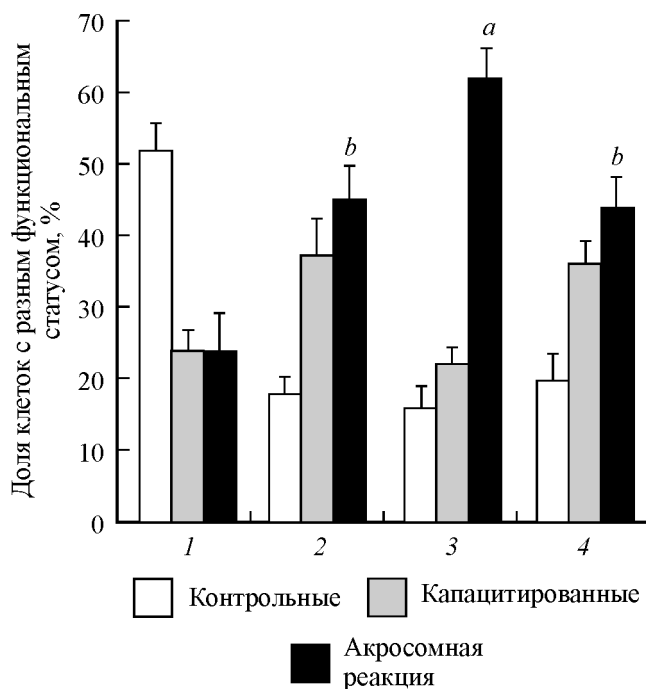


Рис. 5. Влияние пролактина и ГТФ на акросомную реакцию сперматозоидов быков.

По горизонтали: 1 — контрольные клетки (0 ч инкубации), 2 — контрольные клетки (4 ч инкубации), 3 — совместное действие пролактина и ГТФ в концентрациях 10 нг/мл и 10 мкМ соответственно, 4 — действие ингибитора протеинкиназы С Ro 31-8220 в концентрации 2 мкМ с последующей совместной обработкой пролактином и ГТФ. По вертикали — процентное содержание клеток с разным функциональным статусом. Вертикальные отрезки — стандартные ошибки средних значений. Различия достоверны при $P < 0.01$ (a, b).

ного Ca^{2+} через потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы. Наличие и участие в этих процессах внутриклеточных депо кальция только предполагалось, высказывались отдельные предположения о возможном существовании этих депо в сперматозоидах (Publicover, Barratt, 1999).

В среде без добавления внеклеточного Ca^{2+} увеличение концентрации цитозольного Ca^{2+} происходит за счет освобождения Ca^{2+} из внутриклеточных депо. В сперматозоидах животных различного вида — баранов (Dragileva et al., 1999), мышей (O'Toole et al., 2000) и морских ежей (Gonzalez-Martinez et al., 2001) — в подобных условиях отмечали увеличение концентрации цитозольного Ca^{2+} , что свидетельствует о присутствии в этих клетках внутриклеточных депо кальция. В наших экспериментах при использовании среды без внеклеточного Ca^{2+} отмечали изменение интенсивности флуоресценции комплекса ХТЦ— Ca^{2+} , связанного с мембранами внутриклеточных депо, что свидетельствует о возможности освобождения кальция из его внутриклеточных депо в сперматозоидах быков.

В большинстве клеток млекопитающих показано наличие двух типов внутриклеточных депо кальция — инозитолтрифосфат- и рианодин-чувствительные внутриклеточные депо (Berridge, 2002). На мембране сперматозоидов различных видов животных (Naaby-Hansen et al., 2001; Ho, Suarez, 2003; Harper et al., 2004) также обнаружены IP_3 - и рианодин-чувствительные рецепторы. В то же время в сперматозоидах быков при использовании зонда BODIPY FL-X рецепторов к рианодину не выявлено (Ho, Suarez, 2001).

Тапсигаргин преимущественно освобождает Ca^{2+} из тех внутриклеточных депо, на поверхности которых находятся рецепторы к IP_3 (Thastrup et al., 1990). Использование тапсигаргина позволяет определить, на какое из кальциевых депо — IP_3 -чувствительное или IP_3 -нечувствительное — действуют применяемые соединения. Так как тапсигаргин опустошает IP_3 -чувствительные депо, то при действии соединения, активирующего освобождение Ca^{2+} из этих депо, не будет происходить освобождение кальция из внутриклеточных депо. В присутствии тапсигаргина теofilлин и ГТФ вызывали выход Ca^{2+} из внутриклеточных депо, тогда как пролактин и ГДФ в этих условиях не стимулировали освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо (Бойцева и др., 2014). Следовательно, пролактин и ГДФ активируют освобождение Ca^{2+} из IP_3 -чувствительных депо, а теofilлин и ГТФ — из IP_3 -нечувствительных.

Согласно одной из гипотез, ГТФ способствует образованию связи между различными внутриклеточными депо кальция (IP_3 -чувствительными и IP_3 -нечувствительными) и обеспечивает переход Ca^{2+} из IP_3 -нечувствительных в IP_3 -чувствительные внутриклеточные депо. Совместное действие IP_3 и ГТФ способствует дополнительному освобождению Ca^{2+} из внутриклеточных депо (Mullaney et al., 1987; Ghosh et al., 1989). Ранее на ооцитах свиней нами было показано, что при совместном действии пролактина и ГТФ, а также теofilлина и ГДФ происходит дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо (Денисенко, Кузьмина, 2009). На основании этого было предположено, что в ооцитах свиней при действии пролактина, теofilлина, ГТФ и ГДФ происходит перемещение Ca^{2+} между различными внутриклеточными депо, причем при совместном действии пролактина и ГТФ кальций переходит из IP_3 -нечувствительных в IP_3 -чувствительные, при совместном действии теofilли-

на и ГДФ, вероятно, Ca^{2+} перемещается в обратном направлении — из IP_3 -чувствительных в IP_3 -нечувствительные внутриклеточные депо. При этом для возможного перемещения Ca^{2+} между различными внутриклеточными депо необходимо выполнение ряда условий: все используемые соединения должны стимулировать освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо; освобождение Ca^{2+} должно быть связано с выходом иона из IP_3 -чувствительных или IP_3 -нечувствительных внутриклеточных депо; при совместном действии соединений должен регистрироваться дополнительный выход Ca^{2+} из внутриклеточных депо; одним из действующих соединений должен быть ГТФ (или ГДФ).

Как и в ооцитах свиней, для образования связи и обеспечения перехода Ca^{2+} между IP_3 -чувствительными и IP_3 -нечувствительными внутриклеточными депо в сперматозоидах быков необходимо выполнение всех вышеизложенных условий. При взаимодействии между пролактином, теofilлином, ГТФ и ГДФ все эти условия выполняются только при совместном действии пролактина и ГТФ, а также теofilлина и ГДФ. При совместном действии пролактина и теofilлина, ГТФ и ГДФ наблюдается отсутствие гуанинового нуклеотида или, наоборот, присутствуют сразу два. В случае совместного действия теofilлина и ГТФ, и также пролактина и ГДФ не было отмечено дополнительного освобождения Ca^{2+} из внутриклеточных депо, потому как в этих совместно действующих парах освобождение Ca^{2+} происходит из внутриклеточных депо одного типа — IP_3 -чувствительных или IP_3 -нечувствительных.

Таким образом, в сперматозоидах быков из всех изученных вариантов взаимодействия между пролактином, теofilлином, ГТФ и ГДФ только при совместном действии пролактина и ГТФ, а также теofilлина и ГДФ происходит дополнительное освобождение Ca^{2+} , а следовательно, образуется связь и осуществляется трансдукция Ca^{2+} между различными внутриклеточными депо.

Акрсомная реакция, при которой происходит экзоцитоз акросомных пузырьков, является важным этапом оплодотворения. Считают, что связывание сперматозоида с одним из компонентов оболочки яйцеклетки индуцирует вход Ca^{2+} в сперматозоид через неспецифические потенциалзависимые каналы, в результате чего активируется фосфолипаза С (Darszon et al., 2001). Активированная фосфолипаза С генерирует IP_3 , вызывая таким образом мобилизацию Ca^{2+} из внутриклеточного депо сперматозоидов — акросомы, Ca^{2+} -запасяющая способность которой достаточно ограничена (Rossato et al., 2001). В сперматозоидах быков увеличение количества клеток на стадии акросомной реакции отмечали в случае одновременного использования для активации сперматозоидов пролактина и ГТФ. Как указывалось выше, в этом случае предположительно происходит перемещение Ca^{2+} между внутриклеточными депо в направлении из IP_3 -нечувствительных в IP_3 -чувствительные внутриклеточные депо.

В процессах капацитации участвует как внеклеточный, так и внутриклеточный кальций. Показано, что для активации капацитации в сперматозоидах мышей требуется внеклеточный кальций (DasGupta et al., 1993), описано увеличение концентрации внутриклеточного кальция во время прохождения этого процесса (Yanagimachi, 1994). В сперматозоидах быка увеличение количества капацитированных клеток наблюдали в случае совместного использования теofilлина и ГДФ. Полагаем, что в этом случае транзит Ca^{2+} между внутриклеточными депо осу-

ществляется в направлении из IP_3 -чувствительных в IP_3 -нечувствительные внутриклеточные депо. В работах на сперматозоидах быков, мышей и свиней было показано, что протеинкиназы С и А вовлечены в механизмы, контролирующие акросомную реакцию и обмен внутриклеточного кальция, действие этих ферментов носит стимулирующий характер (De Jonge et al., 1991; Narayana, 2013).

В соответствии с изложенными выше фактами мы формулируем гипотезу, согласно которой перемещение Ca^{2+} между внутриклеточными депо сперматозоидов быков, стимулированное совместным действием пролактина и ГТФ или теофиллина и ГДФ, детерминирует функциональный статус сперматозоида. Трансдукция Ca^{2+} между внутриклеточными депо сперматозоидов быков, стимулированная совместным действием пролактина и ГТФ, участвует в регуляции акросомальных процессов, в то время как капацитация сперматозоидов опосредуется перемещением кальция между внутриклеточными депо, активированным воздействием теофиллина и ГДФ.

Список литературы

- Бойцева Е. Н., Денисенко В. Ю., Кузьмина Т. И. 2014. Освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо сперматозоидов быков. В кн.: Конкурентоспособность и качество животноводческой продукции. Жодино, Белоруссия. 20—23. (Boytseva E. N., Denisenko V. Yu., Kuzmina T. I. 2014. Release of Ca^{2+} from intracellular stores spermatozoa of bulls. In: Competitiveness and quality of animal products. Zhodino, Belarus. 20—23.)
- Денисенко В. Ю., Кузьмина Т. И. 2005. Эффект гуаниновых нуклеотидов и протеинкиназы С на стимулированное пролактином освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо ооцитов свиней. Онтогенез. 36 (3) : 1—6. (Denisenko V. Yu., Kuzmina T. I. 2005. Effects of guanine nucleotides and protein kinase C on prolactin-stimulated release of Ca^{2+} from intracellular stores of pig oocytes. Rus. J. Develop. Biol. 36 (3) : 161—165.)
- Денисенко В. Ю., Кузьмина Т. И. 2009. Влияние эстрадиола на освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо ооцитов свиней, стимулированное пролактином, теофиллином и ГТФ. Онтогенез. 40 (1) : 48—55. (Denisenko V. Yu., Kuzmina T. I. 2009. Effect of estradiol on Ca^{2+} exit from intracellular stores of pig oocytes stimulated theophylline, prolactin and guanosinetriphosphate. Rus. J. Develop. Biol. 40 (1) : 38—43.)
- Berridge M. J. 2002. The negative feedback by protein kinase C. J. Biol. Chem. 268 : 8425—8428.
- Chen Y., Cann M. J., Litvin T. N., Iourgenko V., Sinclair M. L., Levin L. R., Buck J. 2000. Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. Science. 289 : 625—628.
- Costello S., Michelangeli F., Nash K., Lefievre L., Morris J., Machado-Oliveira G., Barratt C., Kirkman-Brown J., Publicover S. 2009. Ca^{2+} -stores in sperm: their identities and functions. Reprod. 138 : 425—437.
- Darszon A., Beltran C., Felix R., Nishigaki T., Trevino C. L. 2001. Ion transport in sperm signaling. Develop. Biol. 240 : 1—14.
- DasGupta S., Mills C. L., Fraser L. 1993. Ca^{2+} -related changes in the capacitation state of human spermatozoa assessed by a chlortetracycline fluorescence assay. J. Reprod. Fertil. 99 : 135—143.
- De Jonge C. J., Han H. L., Mack S. R., Zaneveld L. J. 1991. Effect of phorbol diesters, synthetic diacylglycerols, and a protein kinase C inhibitor on the human sperm acrosome reaction. J. Androl. 12 : 62—70.
- Dragileva E., Rubinstein S., Breitbart H. 1999. Intracellular Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase regulates calcium influx and acrosomal exocytosis in bull and ram spermatozoa. Biol. Reprod. 61 : 1226—1234.
- Felix R. 2005. Molecular physiology and pathology of Ca^{2+} -conducting channels in the plasma membrane of mammalian sperm. Reprod. 129 : 251—262.
- Florman H. M., Corron M. E., Kim T. D-H., Babcock D. F. 1992. Activation of voltage-dependent calcium channels of mammalian sperm is required for zona pellucida induced acrosomal exocytosis. Develop. Biol. 152 : 304—314.
- Florman H. M., Jungnickel M. K., Sutton K. A. 2008. Regulating the acrosome reaction. Inter. J. Devel. Biol. 52 : 503—510.
- Fraser L. R., Abeydeera L. R., Niwa K. 1995. Ca^{2+} -regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis. Mol. Reprod. Develop. 40 : 233—241.
- Ghosh T. K., Mullaney J. M., Tarazy F. I., Gill D. L. 1989. GTP-activated communication between distinct inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive and -insensitive calcium pools. Nature. 340 : 236—239.
- Gonzalez-Martinez M. T., Galindo B. E., de De La Toore L., Zapata O., Rodriguez E., Florman H. M., Darszon A. 2001. A sustained increase in intracellular Ca^{2+} is required for the acrosome reaction in sea urchin sperm. Develop. Biol. 236 : 220—229.
- Harayama H. 2013. Roles of intracellular cyclic AMP signal transduction in the capacitation and subsequent hyperactivation of mouse and boar spermatozoa. J. Reprod. Develop. 59 : 421—430.
- Harper C. V., Barratt C. L., Publicover S. J. 2004. Stimulation of human spermatozoa with progesterone gradients to stimulate approach to the oocyte. Induction of $[Ca^{2+}]_i$ oscillations and cyclical transitions in flagellar beating. J. Biol. Chem. 279 : 46 315—46 325.
- Harrison R. A., Miller N. G. 2000. CAMP-dependent protein kinase control of plasma membrane lipid architecture in boar sperm. Mol. Reprod. Develop. 55 : 220—228.
- Herrick S. B., Schweissinger D. L., Kim S. W., Bayan K. R., Mann S., Cardullo R. A. 2005. The acrosomal vesicle of mouse sperm is a calcium store. J. Cel. Physiol. 202 : 663—671.
- Ho H. C., Suarez S. S. 2001. An inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-gated intracellular Ca^{2+} store is involved in sperm hyperactivated motility. Biol. Reprod. 65 : 1606—1615.
- Ho H. C., Suarez S. S. 2003. Characterization of the intracellular calcium store at the base of the sperm flagellum that regulates hyperactivated motility. Biol. Reprod. 68 : 1590—1596.
- Mullaney J. M., Chueh S. H., Ghosh T. K., Gill D. L. 1987. Intracellular calcium uptake activated by GTP. Evidence for a possible guanine nucleotide-induced transmembrane conveyance of intracellular calcium. J. Biol. Chem. 262 : 13 865—13 872.
- Naaby-Hansen S., Wolkowicz M. J., Klotz K., Bush L. A., Westbrook V. A., Shibahara H., Shetty J., Coonrod S. A., Reddi P. P., Shannon J. 2001. Co-localization of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and calreticulin in the equatorial segment and in membrane bounded vesicles in the cytoplasmic droplet of human spermatozoa. Mol. Hum. Reprod. 7 : 923—933.
- O'Toole C. M., Arnoult C., Darzon A., Steinhardt R. A., Florman H. M. 2000. Ca^{2+} entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction. Mol. Biol. Cell. 11 : 1571—1584.
- Parrish J. J., Susko-Parrish J., Winer M. A., First N. L. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. Biol. Reprod. 38 : 1171—1180.
- Publicover S. J., Barratt C. L. 1999. Voltage-operated Ca^{2+} channels and the acrosome reaction: which channels are present and what do they do? Hum. Reprod. 14 : 873—879.
- Rossato M., Di Virgilio F., Rizzuto R., Galeazzi C., Foresta C. 2001. Intracellular calcium store depletion and acrosome reaction in human spermatozoa: role of calcium and plasma membrane potential. Mol. Hum. Reprod. 7 : 119—128.
- Thastrup O., Cullen P. J., Drobak B. K., Hanley M. R., Dawson A. P. 1990. Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 87 : 2466—2470.
- Trevino C. L., Santi C. M., Beltran C., Hernandez-Cruz A., Darzon A., Lomeli H. 1998. Localization of inositol trisphosphate and ryanodine receptors during mouse spermatogenesis: possible functional implications. Zygote. 6 : 159—172.
- Visconti P. E., Galantino-Homer H., Ning X. P., Moore G. D., Valenzuela J. P., Jorgez C. J., Alvarez J. G., Kopf G. S. 1999. Cho-

lesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm. *J. Biol. Chem.* 274 : 3235—3242.

Walensky L. D., Snyder S. H. 1995. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively localized to the acrosome of mammalian sperm. *J. Cell Biol.* 130 : 857—869.

Ward C. R., Storey B. T. 1984. Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay. *Develop. Biol.* 104 : 287—296.

Wassarman P. M., Jovine L., Litscher E. S. 2001. A profile of fertilization in mammals. *Nat. Cell Biol.* 3 : 59—64.

White D. R., Aitken R. J. 1989. Relationship between calcium, cyclic AMP, ATP, and intracellular pH and the capacity of hamster spermatozoa to express hyperactivated motility. *Gamete Res.* 22 : 166—177.

Yanagimachi R. 1994. Mammalian fertilization. In: The physiology of reproduction. Knobil E., Neill J. D. (eds). T New York: Raven Press, Ltd. 189—317.

Поступила 8 X 2014

MOBILIZATION OF Ca^{2+} FROM INTRACELLULAR STORES OF SPERMATOZOA OF *BOS TAURUS* DEPENDING ON THEIR FUNCTIONAL STATUS

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

All-Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding, St. Petersburg—Pushkin;
e-mail: prof.kouzmina@mail.ru

On the basis of inhibitory analysis by using a fluorescence probe chlortetracycline, calcium transduction pathway in spermatozoa of *Bos taurus* has been examined. Additional release of Ca^{2+} from intracellular stores of sperm was found after combined action of prolactin and GTP, which took place under influence of protein kinase C inhibitor (compound Ro 31-8220); the combined effect of theophylline and GDP also stimulated additional release of Ca^{2+} from intracellular stores, which was missing when adding inhibitor of protein kinase A, compound H-89. Using chlortetracycline test (analysis localization of chlortetracycline fluorescence in spermatozoa), we have shown the combined action of prolactin and GTP increases the number of sperm with acrosome reaction, which is reduced after influence of Ro 31-8220; the combined effect of theophylline and GDP increases the percentage of capacitated spermatozoa, which was decreased in the presence of H-89. According with the data obtained, we propose the hypothesis that the transduction of Ca^{2+} between intracellular stores in bull spermatozoa stimulated by the combined action of prolactin and GTP, or theophylline and GDP, determines the functional status of the spermatozoa. Namely: the transduction of Ca^{2+} between intracellular stores in bull spermatozoa stimulated by the combined action of prolactin and GTP is involved in the regulation of acrosomal processes, while sperm capacitation is mediated by the transduction of calcium between intracellular stores activated by the combined influence of theophylline and GDP.

Key words: calcium, capacitation, acrosome reaction, the sperm of bulls.