ИЗМЕНЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СТАТУСА НАТИВНЫХ И ДЕКОНСЕРВИРОВАННЫХ СПЕРМАТОЗОИДОВ БЫКОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ КОФЕИНА*

И.В. Чистякова, аспирант, Т.И. Кузьмина, В.Ю. Денисенко, доктора биологических наук

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал Федерального научного центра животноводства, 196601, Санкт-Петербург-Пушкин, Московское шоссе, 55а
E-mail: itjerena7@gmail.com

Изучено влияние кофеина на функциональный статус нативных и деконсервированных сперматозоидов быков. В интактных незамороженных сперматозоидах быков инкубация в течение 4 ч в присутствии кофеина приводила к росту числа капацитированных и акросома-реактивных клеток, тогда как совместное использование пролактина и гуанозинтрифосфата не оказывало влияние на соотношение числа некапацитированных, капацитированных и акросома-реактивных клеток. Предварительная инкубация сперматозоидов и последующая заморозка приводили к снижению количества капацитированных и повышению акросома-реактивных клеток в размороженных образцах, если для инкубации использовали кофеин, и не влияли на функциональный статус сперматозоидов, если инкубацию проводили в присутствии пролактина и гуанозинтрифосфата. Таким образом, предварительная инкубация сперматозоидов перед замораживанием в присутствии кофеина изменяла функциональный статус клеток после размораживания (уменьшение числа капацитированных клеток), в то же время совместное действие пролактина и гуанозинтрифосфата не оказывало влияния на этот показатель.

THE CHANGE IN THE FUNCTIONAL STATUS OF NATIVE AND CRYOPRESERVED SPERMATOZOA OF BULLS UNDER THE INFLUENCE OF CAFFEINE

Chistyakova I.V., Kuzmina T.I., Denisenko V.Yu.

All-Russian research institute of genetics and breeding of farm animals – the branch of Federal Research Center Livestock, 196601, Sankt-Peterburg-Pushkin, Moscovskoe sh., 55 a
E-mail: itjerena7@gmail.com

The aim of the study is to study the effect of caffeine on the functional status of native and thawed bovine spermatozoa. Incubation of intact non-frozen bovine spermatozoa during 4 hours with caffeine increased the number of capacitated and acrosome-reactive cells, while the incubation in the presence of combination prolactin/ guanosine triphosphate did not affect the proportion of uncapacitated, capacitated, and acrosome-reactive cells. Pre-incubation of spermatozoa and the subsequent freezing led to the increase in number of capacitated spermatozoa and acrosome-reactive cells in thawed samples, incubated with the caffeine, and there was no effect on functional status of spermatozoa incubated with prolactin and guanosine triphosphate. Thus, pre-incubation of spermatozoa before freezing with the caffeine altered their functional status after thawing (the decrease in the number of capacitated cells), while the combined action of prolactin and guanosine triphosphate did not affect indicator.

Ключевые слова: инкубация, заморозка, функциональный статус, сперматозоиды быков

Key words: incubation, freezing, functional status, bovine spermatozoa

Криоконсервация спермы является важным инструментом вспомогательных репродуктивных технологий, хотя оплодотворяющая способность замороженных сперматозоидов до сих пор остается невысокой [1,2]. Было показано, что процедуры криоконсервации индуцируют изменения, сходные с преобразованиями, происходящими в сперматозоидах во время капацитации [3,4]. Недавние исследования показали сходство между механизмами капацитации и криоповреждений, такими как реорганизация плазматической мембраны, псевдоожижение и приток кальция к сперматозоидам [5,6]. Поэтому при частичной или полной криоконсервации сперматозоидов изменения, аналогичные происходящим при капацитации и выявляемые с помощью хлортетрациклинового теста (капацитированные клетки), позволяют сперматозоидам проходить акросомную реакцию и оплодотворять ооциты *in vitro* [7]. Опосредованная замораживанием капацитация может частично отвечать за снижение продолжительности жизни сперматозоидов в половых путях самки и, следовательно, за снижение эффективности искусственного осеменения замороженной спермой.

Совершенствование протоколов криоконсервации спермы позволило бы преодолеть множество проблем, связанных со снижением качества размороженной спермы [8,9]. Ранее было показано, что инкубация замороженных сперматозоидов совместно с гепарином оказывает положительное влияние на оплодотворяющую способность спермы, а также на показатели дробиления эмбрионов, полученных в результате оплодотворения [10].

Использование кофеина было связано с необходимостью активации в сперматозоидах быков процессов капацитации [11], в то же время совместное действие пролактина и гуанозинтрифосфата приводило к активации акросомной реакции [12].

Целью работы было изучение влияния кофеина на функциональный статус нативных и деконсервированных сперматозоидов быков.

Методика. В исследовании были использованы образцы спермы быков черно-пестрой породы, полученные непосредственно перед экспериментом. Для того, чтобы удалить семенную плазму, сперму двукратно центрифугировали при 300 g в течение 10 мин в сре-

*Работа выполнена в рамках Госзадания №АААА-А18-118021590132-9.

Рис. 1. Влияние различных соединений на функциональный статус интактных сперматозоидов быков. По горизонтали: 1 – клетки без инкубации; 2 – клетки, инкубированные 4 ч без добавок (K); 3 – K + кофеин в концентрации 2 мМ; 4 – K + ПРЛ и ГТФ в концентрации соответственно 10 нг/мл и 10 мкМ. Разность достоверна при ^{h,c}; ^{h,b}; ^{h,e}; ^{i,l}; ^{g,a}; ^{g,j} - $P < 0,001$, ^{h,k} - $P < 0,05$.

Рис. 2. Влияние предварительной инкубации сперматозоидов быков перед заморозкой на функциональный статус клеток после размораживания. По горизонтали: 1 – клетки без инкубации; 2 – клетки, инкубированные 4 ч без добавок (K); 3 – K + кофеин в концентрации 2 мМ; 4 – K + ПРЛ и ГТФ в концентрации соответственно 10 нг/мл и 10 мкМ. Разность достоверна при ^{h,k} - $P < 0,001$, ^{i,l} - $P < 0,01$, ^{h,e}; ^{i,f} - $P < 0,05$.

де Sp-TALP, состоявшей из 100 мМ NaCl, 3,1 мМ KCl, 25 мМ NaHCO₃, 0,3 мМ NaH₂PO₄, 21,6 мМ лактата натрия, 0,5 мМ CaCl₂, 0,4 мМ MgCl₂, 10 мМ HEPES, 1 мМ пирувата натрия и 0,1% поливинилалкоголя. Экспериментальные образцы инкубировали в среде Sp-TALP с 6 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (БСА) без или в присутствии различных веществ: 2 мМ кофеина, 10 нг/мл пролактина (ПРЛ) и 10 мкМ гуанозинтрифосфата (ГТФ). Инкубацию проводили при 38 °C в атмосфере 5% CO₂, 95%-ной влажности в течение 4 ч. Смешанный с разбавителем в соотношении 1:1 эякулят быков (27 °C) охлаждали до 18-22 °C, после чего проводили итоговое разбавление, фасовку и эквивирацию (экспозиция при 4 °C в течение 3-4 ч). Замораживание сперматозоидов осуществляли до температуры -145 °C в течение 7,5 мин и хранили при -196 °C

в жидком азоте. Пайеты со спермой размораживали на водяной бане (38,5 °C) в течение 1 мин.

После размораживания из каждого экспериментального образца брали по 20 мкл клеточной суспензии и смешивали с 20 мкл 750 мкМ раствора хлортетрациклина (ХТЦ), приготовленного на среде, содержащей 130 мМ NaCl, 5 мМ L-цистеина, 20 мМ Трис (pH = 7,8). Клетки экспонировали в растворе ХТЦ в течение 10 мин при 38,5 °C, после чего фиксировали 10 мкл 25% глутеральдегида в 1мМ растворе Триса (pH=7,8) с конечной концентрацией глутеральдегида 0,1%. Оценку клеток проводили в соответствии с тремя типами флуоресценции ХТЦ: клетки с равномерной флуоресценцией всей головки считали некапацитированными; сперматозоиды с наличием свободного от флуоресценции участка в постакросомальной зоне – капацитированными; клетки с нефлуоресцирующей головкой, за исключением тонкой яркой полосы в экваториальном районе, характерной для акросома-реактивных клеток.

Достоверность разности полученных значений оценивали с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Процедуры криоконсервации, такие как разведение, охлаждение, замораживание/оттаивание, активируют в сперматозоидах изменения, аналогичные происходящим в этих клетках при капацитации [13]. Считается, что криокапацитация является в значительной степени ответственной за снижение оплодотворяющей способности замороженной/оттаявшей бычьей спермы. После разморозки сперматозоидов быков отмечается высокий процент клеток на стадии капацитации, и чем их больше, тем хуже качество образца в целом [14]. Так как большое количество капацитированных клеток после разморозки свидетельствует о низком качестве образца, можно предположить, что

способ, позволяющий уменьшить число капацитированных клеток после размораживания, позволит также улучшить их качество после размораживания. Ранее нами было показано, что предварительная капацитация сперматозоидов быков перед заморозкой в присутствии соединений, стимулирующих капацитацию (dbcAMP, гепарин), после размораживания приводила к снижению количества капацитированных и повышению числа жизнеспособных клеток [15]. В данной работе для предварительной инкубации перед заморозкой использовали соединения, стимулирующие капацитацию в клетках (кофеин), и вещества, не оказывающие влияние на этот процесс (ПРЛ и ГТФ).

Инкубация интактных незамороженных сперматозоидов быков в течение 4 ч в присутствии кофеина в концентрации 2 мМ приводила к повышению числа ка-

пацитированных клеток, тогда как совместная инкубация ПРЛ и ГТФ в концентрации соответственно 10 нг/мл и 10 мкМ не влияла на этот показатель (рис. 1). Одновременно с этим отмечали, что во время инкубации в присутствии ПРЛ и ГТФ было повышенным число некапацированных клеток и снижалось количество акросома-реактивных клеток в сравнении с действием на сперматозоиды кофеина.

Предварительная инкубация сперматозоидов быков перед заморозкой в течение 4 ч в присутствии кофеина после размораживания клеток приводила к снижению количества капацированных и увеличению числа акросома-реактивных клеток в сравнении с контролями на 0 и 4 ч инкубации без добавок (рис. 2). Данные по предварительной инкубации сперматозоидов перед заморозкой в присутствии ПРЛ и ГТФ после размораживания не отличались от показателей, полученных при инкубации клеток без добавок.

Таким образом, инкубация сперматозоидов быков в течение 4 ч без последующей заморозки способствовала повышению количества капацированных клеток в случае использования кофеина и не оказывала влияния на число капацированных сперматозоидов при инкубации в присутствии ПРЛ и ГТФ. Предварительная инкубация сперматозоидов до заморозки в течение 4 ч в присутствии кофеина изменяла функциональный статус клеток после размораживания – приводила к снижению числа капацированных сперматозоидов, при этом количество акросома-реактивных клеток по-прежнему оставалось высоким.

Литература.

1. Nongbua T. Adding bovine seminal plasma prior to freezing improves post-thaw bull sperm kinematics but decreases mitochondrial activity // *Systems biology in reproductive medicine*. – 2018. – V. 64. – № 3. – P. 183-190.
2. Paudel B., Gervasi M.G., Porambo J., Caraballo D. Sperm capacitation is associated with phosphorylation of the testis-specific radial spoke protein Rsph6a // *Biology of Reproduction*. – 2018. – V. 100. – № 2. – P. 440-454.
3. Murphy E.M. Effect of increasing equilibration time of diluted bull semen up to 72 h prior to freezing on sperm quality parameters and calving rate following artificial insemination // *Theriogenology*. – 2018. – V. 108. – P. 217-222.
4. Talukdar D.J., Ahmed K. and Talukdar P. Cryocapacitation and fertility of cryopreserved semen // *International Journal of Livestock Research*. – 2015. – № 5. – P. 11-18.
5. Alm-Kristiansen A.H. In vitro studies of Norwegian Red bovine semen immobilized and cryopreserved in alginate solid gel network // *Reproduction of domestic animals*. – 2018. – V. 53. – № 2. – P. 365-370.
6. Naresh S. Effect of cooling (4°C) and cryopreservation on cytoskeleton actin and protein tyrosine phosphorylation in buffalo spermatozoa // *Cryobiology*. – 2016. – V. 72. – № 1. – P. 7-13.
7. Ded L. In vivo exposition to 17B-estradiol cause premature capacitation of epididymal mouse sperm // *Biology of reproduction*. – 2012. – V. 87. – № 1. – P. 433-433.
8. Forero-Gonzalez R.A., Celeghini E.C.C., Raphael C.F., Andrade A.F.C., Bressan F.F., Arruda R.P. Effects of bovine sperm cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotective agents on plasma, acrosomal and mitochondrial membranes // *Andrology*. – 2012. – № 44. – P. 154-159.
9. Kadirvel G, Kathiravan P, Kumar S. Protein tyrosine phosphorylation and zona binding ability of in vitro capacitated and cryopreserved buffalo spermatozoa // *Theriogenology*. – 2011. – V. 75. – № 9. – P. 1630-1639.
10. Elkhawagah A.R. Evaluation of in vitro capacitation of buffalo frozen/thawed sperm by different techniques // *Journal of reproduction and infertility*. – 2013. – V. 4. – № 3. – P. 19-28.
11. Breiningner E., Cetica P.D., Beconi M.T. Capacitation inducers act through diverse intracellular mechanisms in cryopreserved bovine sperm // *Theriogenology*. – 2010. – V. 74. – № 6. – P. 1036-1049.
12. Денисенко В.Ю., Бойцева Е.Н., Кузьмина Т.И. Освобождение Ca²⁺ из внутриклеточных депо сперматозоидов *Bos taurus* в зависимости от их функционального состояния // *Цитология*. – 2015. – Т. 57. – № 3. – С. 233-239.
13. Mostek A., Dietrich M.A., Słowińska M., Ciereszko A. Cryopreservation of bull semen is associated with carbonylation of sperm proteins // *Theriogenology*. – 2017. – V. 92. – P. 95-102.
14. Cormier N., Bailey J. L. A differential mechanism is involved during heparin- and cryopreservation-induced capacitation of bovine spermatozoa // *Biology of reproduction*. – 2003. – V. 69. – P. 177-185.
15. Денисенко В.Ю., Кузьмина Т.И., Бойцева Е.Н. Индукция капацитации сперматозоидов *Bos taurus* до криоконсервации повышает их жизнеспособность после размораживания // *Гены и клетки*. – 2018. – Т. XIII. – № 1. – С. 86-91.

Поступила в редакцию 17.01.19

После доработки 20.02.19

Принята к публикации 15.03.19