

КАПАЦИТАЦІЯ ТА АКРОСОМНА РЕАКЦІЯ СПЕРМІЇВ БУГАЇВ ПРИДАТКА СІМ'ЯНИКА IN VITRO: БІОХІМІЧНИЙ ТА БІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ АСПЕКТИ

Д. Д. Остапів

Інститут біології тварин УААН

Досліджували інтенсивність окисних процесів у сперміях з придатка сім'яника бугаїв за дії факторів капацитації in vitro. Виявлено, що в присутності фолікулярної рідини та гепарину спермії проявляють гіперактивний рух та характеризуються більшим споживанням кисню і відновною здатністю, вищою активністю глюкозо-6-фосфатдегідрогенази та сукцинатдегідрогенази. Підвищення ціанідрезистентного дихання вказує на стимуляцію факторами капацитації вільнорадикального окиснення структур мембран спермій, що забезпечує прояв акросомної реакції.

Ключові слова: ПРИДАТОК СІМ'ЯНИКА, СПЕРМІЙ, СПОЖИВАННЯ КИСНЮ, ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТДЕГІДРОГЕНАЗА, СУКЦИНАТДЕГІДРОГЕНАЗА, ВІДНОВНА ЗДАТНІСТЬ.

У сперміях ссавців під час руху по родових шляхах самки відбуваються морфологічні та біохімічні зміни, які зумовлюють їх підготовку до запліднення ооцита. Вони характеризуються акросомною реакцією та гіперактивним рухом спермій [1]. При заплідненні ооцитів in vitro такі зміни в сперміях викликають шляхом використання середовищ різного складу з відповідним рН та осмотичним тиском, факторів капацитації [2, 3]. При цьому капацитацію проходять не тільки спермії з еякуляту, але й з придатка сім'яника. У сперміях відбуваються зміни в ділянці акросоми, вивільняються та активуються мембранозв'язані ферменти [4]. Найчастіше для капацитації спермій in vitro використовують гепарин, який стимулює фосфорилування тирозину білків не впливає на вміст холестеролу у мембранах спермій та на внутрішньоклітинний вміст кальцію і цАМФ, зв'язування білків плазми сперми, які гальмують капацитацію [5–8]. На відміну від штучного середовища, природний фактор капацитації — фолікулярна рідина містить білки, фактори росту, гормони, пептиди, енергетичні субстрати та інші сполуки, які мають комплексний вплив на спермії та стимулюють витік холестеролу із мембран статевих клітин. Отже, умови стимулювання капацитації спермій in vitro і в родових шляхах корів суттєво відрізняються. У зв'язку з цим метою було дослідження залежності між проявом акросомної реакції та інтенсивністю окисно-відновних процесів у сперміях, отриманих з придатка сім'яника бугаїв при капацитації in vitro за дії фолікулярної рідини та гепарину.

Матеріали і методи

Для досліджень використовували спермії з придатка сім'яника бугаїв у віці 10–16 міс., забитих на м'ясопереробному підприємстві УВСП «Галев-Ресурс». Спермії отримували шляхом надрізу стінки каналу придатка з наступним вимиванням їх розчином натрію цитрату (2,8 %) або натрію хлориду (0,9 %). Суспензію спермій зберігали 6–8 год при температурі 0–+4 °С. Після цього їх інкубували 30, 60 і 120 хв при температурі +38 °С з додаванням факторів капацитації: фолікулярної рідини (ФР; неінактивована, отримана аспірацією з фолікула діаметром > 1,5 см, 20 % за об'ємом) та гепарину (ГП, концентрація у зразку — 100 од/мл). Досліджували: стан акросоми спермій впродовж інкубування [9]; інтенсивність споживання кисню — полярографічно (нг-атом О / 0,1мл суспензії спермій (СС) за хв) та відновну активність — потенціометрично (фериціанід калію — 10⁻⁴М; мкг перетвореного K₃[Fe(CN)₆] (K₃...) / 0,1 мл суспензії спермій (СС) за хв) при температурі +

38,5 °С у фосфатно-сольовому буфері (ФСБ; NaCl — 0,8 г, KCl — 0,02 г, Na₂HPO₄ — 0,11 г, KH₂PO₄ — 0,02 г, MgCl₂ — 0,01 г, H₂O до 100 мл; рН 7,4) з використанням інгібіторів: гліколізу — натрію фториду (NaF; 10⁻³М), НАД-залежної ланки дихального ланцюга — аміталу (AM; 5*10⁻³М), термінальної ланки — натрію азиду (NaN₃; 5*10⁻²М); активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (Г-6-ФДГ; мкМ НАДФН / хв*мл) [10, 11] та сукцинатдегідрогенази (СДГ; мкМ/хв*л) [12].

Отримані результати опрацьовані статистично [13].

Результати й обговорення

Встановлено, що під час інкубації сперміїв у середовищі, до якого додавали фактори капацитації, відбуваються морфологічні зміни: форма головки перетворюється з продовгувато-округлої у загострену, в ділянці акросоми появляються вип'ячування та вгнутості, поверхня шорсткувата, зникає серповидна переділка — акросома : головка. При інкубуванні у середовищі з ФСБ через 30 хв кількість сперміїв з морфологічними змінами становить 19,2±2,03 %, через 60 хв — зростає на 13,8 %, а через 2 год — максимальна (38,6±3,26 %; рис. 1).

У середовищі з ФР та ГП через 30 хв інкубації кількість сперміїв з акросомною реакцією становила 36,2 %, тобто майже досягла рівня встановленого при інкубації сперміїв у середовищі ФСБ через 120 хв. Після інкубації протягом 60 хв кількість клітин з морфологічними змінами далі зростала: фолікулярна рідина стимулювала збільшення кількості сперміїв з акросомною реакцією на 22,3 %, а гепарин — на 12 %. Через 120 хв при дії фолікулярної рідини кількість сперміїв із морфологічними змінами в ділянці акросоми майже не змінювалась (59,4±3,08 %), а в присутності гепарину зростала до 61,6±4,02 %, тобто на 17,0 %.

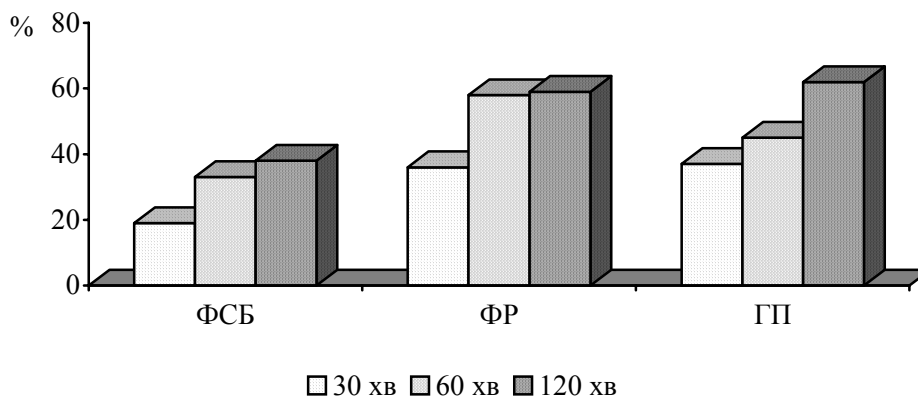


Рис. 1. Кількість сперміїв з акросомною реакцією в зв'язку з фактором та тривалістю капацитації

Отже, фактори капацитації стимулюють прояв акросомної реакції у сперміях при датка сім'яника. При цьому в середовищі з фолікулярною рідиною кількість сперміїв із морфологічними змінами в ділянці акросоми найбільше зростає протягом перших 60 хв, а з гепарином — 120 хв.

Прояв акросомної реакції зумовлюють окисні процеси, що протікають в сперміях та середовищі за дії факторів капацитації. Зокрема виявлено, що ці фактори підвищують дихальну активність сперміїв у два рази ($p < 0,001$) в присутності ФР (9,8±1,04 нг-атом O / 0,1 мл СС за хв) та ГП (10,5±1,11 нг-атом O / 0,1мл СС за хв), порівняно з ФСБ (4,8±0,65 нг-атом O / 0,1мл СС за хв; рис. 2).

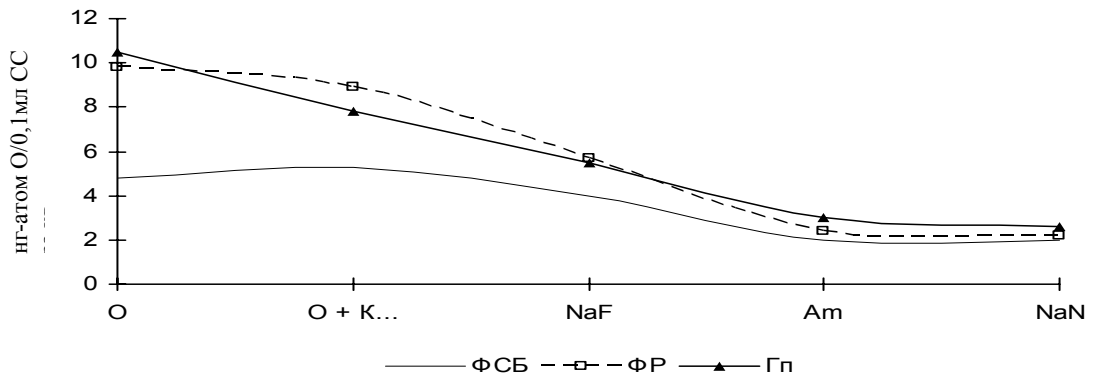


Рис. 2. Дихальна активність спермій за дії факторів капацизації (O — споживання кисню; O+K... — споживання кисню при додаванні $K_3[Fe(CN)_6]$; NaF (натрій фторид); Am (амітал); NaN (натрій азид) — споживання кисню при додаванні інгібіторів ланок ланцюга дихання)

Таким чином, встановлено позитивний зв'язок між кількістю спермій з акросомною реакцією та дихальною активністю спермій за дії досліджуваних факторів капацизації.

Додавання фериціаніду калію в середовище капацизації знижувало поглинання кисню на 10,3 % у присутності фолікулярної рідини та на 25,8 % у присутності гепарину, що свідчить про дефіцит акцепторів (кисню) у середовищі і перерозподіл потоку електронів на зовнішньоклітинний акцептор. При цьому, швидкість перетворення фери- у фероціанід калію була вища на 33,3 % у присутності ФР та на 25,0 % — у присутності ГП, порівняно з ФСБ ($0,4 \pm 0,13$ мкг Кз.../0,1мл СС за хв; рис. 3.). Тобто, поряд з дихальною активністю, фактори

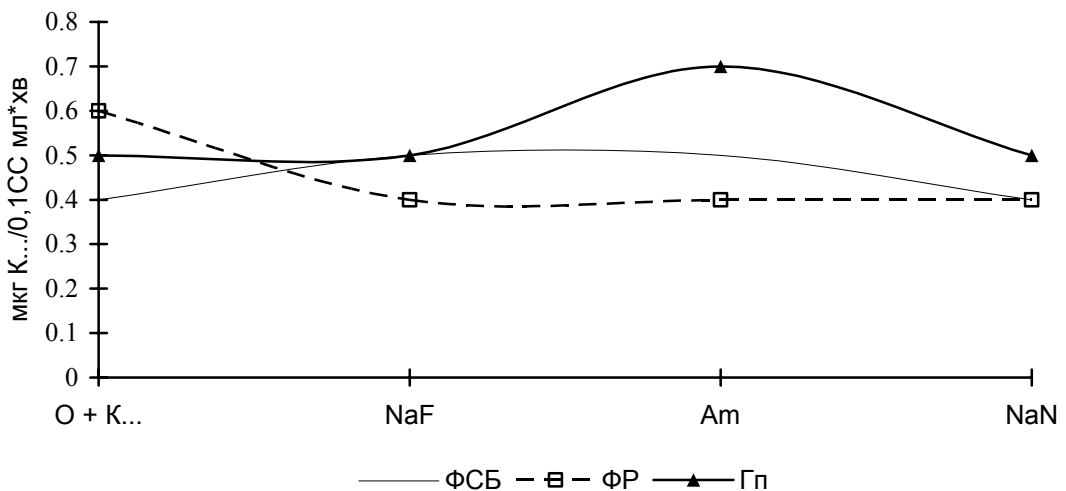


Рис. 3. Відновна активність спермій за дії факторів капацизації (O+K... — відновна активність при додаванні $K_3[Fe(CN)_6]$; NaF (натрій фторид); Am (амітал); NaN (натрій азид) — відновна активність при додаванні інгібіторів ланок ланцюга дихання)

капацизації стимулювали потік електронів у позаклітинний простір: найбільше ($0,6 \pm 0,11$ мкг Кз.../ 0,1мл СС за хв) за дії фолікулярної рідини, менше ($0,5 \pm 0,05$ мкг Кз.../ 0,1мл СС за хв) за дії гепарину і найменше ($0,4 \pm 0,13$ мкг Кз.../0,1мл СС за хв) за дії ФСБ.

Відомо, що одним із генераторів відновних еквівалентів у клітинах є гексозомонофосфатний шлях (ГМФШ), котрий забезпечує постачання електронів на $НАДФ^+$ [14, 15]. Дослідження активності Г-6-ФДГ, ферменту з якого починається перетворення фосфогексоз у пентозофосфатному циклі та відновлення НАДФ, підтверджено, що додавання до середовища ФР та ГП підвищує його активність, відповідно, на 9,0 % та 15,3 % (рис. 4.).

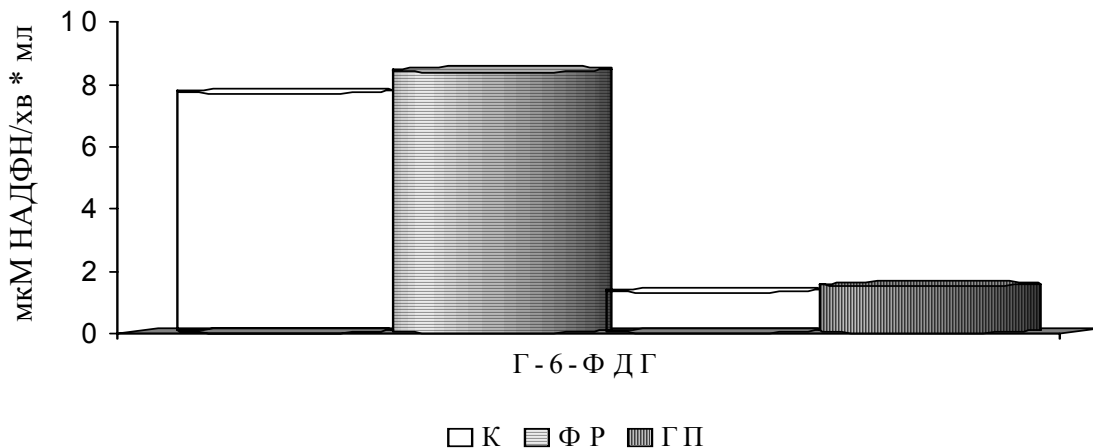


Рис. 4. Активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази в сперміях придатка сім'яника в присутності факторів капацитації

Аналіз результатів досліджень свідчить, що фактори капацитації стимулюють споживання кисню та відновну здатність спермій, яка зумовлена посиленням окиснення глюкози у пентозофосфатному циклі. Ці зміни вказують на посилену генерацію АТФ сперміями та збільшення у середовищі капацитації кислих продуктів метаболізму, що призводить до зниження рН. Внаслідок цього, підвищується проникність мембран мітохондрій для субстратів. Підвищене споживання кисню та зростаюча відновна активність спермій внаслідок стимулювання гексозомонофосфатного шляху, свідчить про збільшення продукції активних форм кисню (H_2O_2 , O_2^- , HO^\bullet і 1O_2), які проявляють деструктивний вплив на мембрани мітохондрій та інших органел, що узгоджується з результатами досліджень інших авторів [16, 17, 18]. Такий стан окисно-відновних процесів з одного боку, полегшує проникнення та окиснення у мітохондріях енергетичних субстратів, що призводить до підвищення генерації АТФ і є стимуляції рухливості спермій, з другого — призводить до змін акросоми.

Дослідження особливостей впливу факторів капацитації на окремі ланки метаболізму спермій шляхом використання інгібіторів показали, що пригнічення гліколізу знижувало споживання кисню на 24,6 % у ФСБ ($4,0 \pm 0,13$ нг-атом O / $0,1$ мл СС за хв), на 33,3 % при додаванні ФР ($5,7 \pm 1,30$ нг-атом O / $0,1$ мл СС за хв) та на 25,0 % при додаванні ГП ($5,5 \pm 0,88$ нг-атом O / $0,1$ мл СС за хв). З цих даних випливає, що за рахунок аеробного гліколізу спермії у середовищах капацитації використовують більше кисню, порівняно з ФСБ. Крім цього, після додавання фториду та за дії факторів капацитації спермії поглинають більше кисню, порівняно з ФСБ, що свідчить про вищу активність ферментів дихального ланцюга та альтернативні джерела постачання субстратів у цикл трикарбонних кислот та дихальний ланцюг. Одночасно з інгібуванням гліколізу, зростає швидкість відновлення фериціаніда на 20,0 % у ФСБ ($0,5 \pm 0,11$ мкг $K_3...$ / $0,1$ мл СС за хв), а при додаванні ФР — знижується на 33,3 % ($0,4 \pm 0,11$ мкг $K_3...$ / $0,1$ мл СС за хв) і не змінюється при додаванні ГП ($0,5 \pm 0,14$ мкг $K_3...$ / $0,1$ мл СС за хв). Отже, у ФСБ підвищення відновної здатності спермій зумовлено гліколізом, гальмування якого обмежує внутрішньоклітинний обмін електронами, внаслідок чого стимулюється їх потік на зовнішньоклітинний акцептор. ФР, при інгібуванні гліколізу, зниженні дихальної і відновної активності спермій, виснажує як внутрішньоклітинні відновники, так і редукцію піридинових нуклеотидів. Можливо такою особливістю впливу ФР на метаболізм спермій зумовлена вища кількість статевих клітин з морфологічними змінами у ділянці акросоми через 60 хв інкубації, порівняно з дією ФСБ та ГП.

Аналіз активності НАД-залежної ланки ланцюга дихання спермій за дії факторів капацитації та аміталу, свідчить, що її інгібування призводить до зменшення поглинання кисню сперміями: у ФСБ на 50,0 % ($2,0 \pm 0,42$ нг-атом O / $0,1$ мл СС за хв), при додаванні ФР та ГП, відповідно, на 42,1 та 52,7 % ($2,4 \pm 0,72$ та $2,9 \pm 1,12$ нг-атом O / $0,1$ мл СС за хв). Однак, незважаючи на зменшення споживання кисню, фактори капацитації забезпечують вищу дихальну активність спермій (на 12,7 % з ФР та на 31,1 % з ГП), порівняно з ФСБ. При дії

аміталу підвищується відновна здатність статевих клітин у середовищі з ГП на 40,0 % (до $0,7 \pm 0,12$ мкг $K_3.../0,1$ мл СС за хв), а з ФСБ та ФР — не змінюється і становить, відповідно, $0,5 \pm 0,05$ та $0,4 \pm 0,11$ мкг $K_3.../0,1$ мл СС за хв. Отже, ГП стимулює потік електронів до НАД-залежної ланки дихального ланцюга, а її інгібування зумовлює відтік атомів водню з циклу трикарбонових кислот (ЦТК) на зовнішньоклітинний акцептор. Встановлена особливість впливу ГП на ЦТК спермій узгоджується з результатами дослідження СДГ за дії факторів капацитації (рис. 5). Так, у ФСБ активність ферменту становила $7,9 \pm 0,83$ мкМ / хв*л, після додавання ГП зростає на 16,9 %, а під впливом ФР знизилася на 35,5 %.

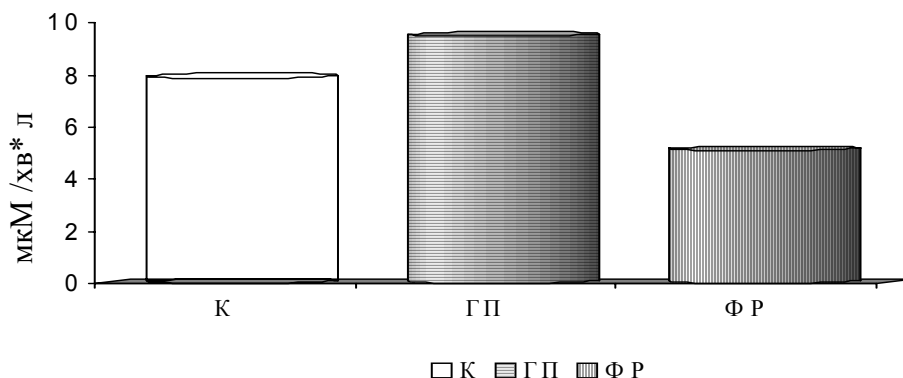


Рис. 5. Активність сукцинатдегідрогенази в сперміях придатка сім'яника за дії факторів капацитації

У результаті дослідження активності термінальної ланки дихального ланцюга встановлено, що інгібування цитохромоксидази азидом натрію не впливає на поглинання кисню сперміями у ФСБ ($2,0 \pm 0,57$ нг-атом $O/0,1$ мл СС за хв) і призводять до зниження на 9,0 % при додаванні ФР та на 11,5 % при додаванні ГП. Проте дихальна активність спермій залишається вищою у середовищі з факторами капацитації, відповідно, на 10,0 та 30,0 %, порівняно з ФСБ. Відновна активність спермій при дії інгібітору зменшувалася на 20,0 % у ФСБ і була однаковою у середовищі з ФР ($0,4$ мкг $K_3.../0,1$ мл СС за хв), а у середовищі з ГП знижувалась на 28,6 %. При цьому відновна активність у середовищі з ГП була вища на 25,0 %, порівняно з середовищем ФСБ та з ФР.

Отже, дослідженнями впливу ФР та ГП, як факторів капацитації, на інтенсивність окисно-відновних процесів у сперміях встановлено їх стимулюючу дію. При цьому у всіх ланках, де проходить генерація АТФ, виявлено більше поглинання кисню, порівняно з ФСБ. Подібно зростає ціанідрезистентне дихання (10,0–30,0 %), що свідчить про стимуляцію немітохондріальних кисень-залежних процесів і узгоджується з вищою активністю Г-6-ФДГ. З отриманих результатів випливає, що механізми дії ФР та ГП, як факторів капацитації, на дихальну і відновну здатність спермій та активність СДГ відрізняються. ФР стимулює аеробний гліколіз і окиснення внутрішньоклітинних відновників, а ГП — аеробний гліколіз й використання у ЦТК проміжних продуктів катаболізму білків, жирів та вуглеводів. Вказані ланки метаболізму постачають електрони як у дихальний ланцюг, так у позаклітинний простір, що забезпечує генерацію АТФ та процеси вільнорадикального окиснення, зміни структур мембран, в тому числі, мітохондрій та акросоми.

Висновки

Спермії придатка сім'яника *in vitro* в присутності фолікулярної рідини та гепарину проявляють гіперактивний рух та акросомну реакцію. В них підвищується дихальна та відновна здатність, активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази та сукцинатдегідрогенази. Зі збільшенням частки мітохондріального дихання зростає ціанідрезистентне дихання, а також інтенсивність немітохондріальних кисень-залежних процесів, що є передумовою змін структури мембран спермій та прояву акросомної реакції. Кількість спермій з акросомною реакцією проявляє позитивний зв'язок із досліджуваними біохімічними показниками за дії факторів капацитації.

**CAPACITACION AND ACROSOMAL REACTION
OF EPIDIDYMAL BULL SPERMATOZOA IN VITRO:
BIOCHEMICAL AND BIOTECHNOLOGICAL ASPECTS**

S u m m a r y

Intensity of oxidizing processes in epididymal bull spermatozoa for the actions of factors of capacitation in vitro has been investigated. It is discovered that gametes in the presence of follicular fluid and heparin show hyperactive motility and is characterized by the higher values of oxygen uptake and reduction activity and increase of glucose-6-phosphate dehydrogenase and succinate dehydrogenase activity. The increase of the cyanid resistance breathing specifies on stimulation by the factors of capacitation oxidizing of structures membranes of spermatozoa, that by the provides the display of acrosomal reaction.

The Institute of Animal of the Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Lviv

1. *Kaj V. I., Robertson L.* Hyperactivated motility of human spermatozoa: a riview of physiological function and application in assisted reproduction. // Hum. Reprod. Update. — 1998. — V.4. — №6. — P.776–786.

2. *Ковтун И. С.* Успешное использование эпидидимальных сперматозоидов быков для получения эмбрионов крупного рогатого скота вне организма. // Використання сучасних молекулярно-генетичних і біотехнологічних розробок у генетико-селекційних дослідженнях. К.:Аграрна наука, 1998. — С. 106–107.

3. *Yao Y., Yeung W. S.* Effects of human follicular fluid on the capacitation and motility of human spermatozoa. // Fertil.Steril. — 2000. — V.7. — №4. — P. 680–686

4. *Lecerck P., de Lamirande E., Gagnon C.* Interaction between Ca⁺, cyclse 3,5 adenosine monophosphate, the superoxide anion and tyrosine phosphorylation parthways in the regulation of humen sperm capacitation. //J. Androl. — 1998. — V 19. — №4. — P. 434–443.

5. *Galantino-Homer H. L., Visconti P. E., Kopf G. S.* Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3'5'-monophosphate-dependent pathway.// Biol. Reprod. — 1997. — V. 56. — P. 707–719.

6. *Lane M., Therien I., Moreau R.* Heparin and high-density lipoprotein mediate bovine sperm capacitation by different mechanisms. //Biol. Reprod. — 1999. — V.60 (1). — P. 169–175.

7. *Miller D. J., Winer M. A., Ax R. L.* Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. //Biol. Reprod. — 1990. — V.42. — P. 899–915.

8. *Therien I., Bleau G., Manjunath P.* Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. //Biol. of Reprod. — 1995. — V.52. — № 6. — P. 1372–1379.

9. *Gross N. L., Meizel S.* Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. // Biol. Reprod. — 1989. — V.41. — № 4. — P. 635–642.

10. *Farnararo M., Favilli F., Tonelli M. F., Bruni P.* Some properties of glucose-6-phosphate dehydrogenase from rat and chick brain: a comparative study. // Comp. Biochem. Physiol. — 1978. — V.61B. — №3. — P. 351–356.

11. *Gruceanu A., Bucsa L.* Age differences in the glucose-6-phosphate dehydrogenase activity of homogenates from the liver of rats. // Rev. Roum. Morfol. Embryol. Physiol. — 1979. — V.16. — №5. — P. 71–75.

12. *Чухрій Б. М., Клевець Л. О., Остапів Д. Д.* Колориметричний спосіб визначення активності сукцинатдегідрогенази в спермі бугаїв. // Вісник аграрної науки. — 1995. — №1. — С. 73–75.

13. *Плохинский Н. А.* Руководство по биометрии для зоотехников. — М.: Колос, 1969. —255 с.

14. *Urner F., Sakkas D.* Characterization of glycolysis and pentose phosphate pathway activity during sperm entry into the mouse oocyte. // *Biol. Reprod.* — 1999. — V.60. — P. 973–978.
15. *Urner F., Sakkas D.* A possible role for the pentose phosphate pathway of spermatozoa in the mouse. // *Biol. Reprod.* — 1999. — V.60. — P. 733–739.
16. *De Lamirande E., Gagnon C.* Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. // *Free Radical Biology and Medicine.* — 1993. — V.14. — P. 157–163.
17. *De Lamirande E., Gagnon C.* Capacitation-associated production of superoxide anion by human spermatozoa. // *Free Radical Biology and Medicine.* — 1995. — V.18. — P. 487–495.
18. *Vorup-Jensen T., Hiort T., Abraham-Peskir I. V.* X-ray microscopy of human spermatozoa shows change of mitochondrial morphology after capacitation. // *Hum. Reprod.* — 1999. — V.14(4). — P. 880–884.