

уровень рентабельности производства молока в подопытных группах был практически одинаковым (38,5% в контрольной и 39,2% в опытной).

Заключение. Следовательно, скармливание сухого свекловичного жома в составе комбикормов для дойных коров оказывает положительное влияние на процессы пищеварения и обмена веществ в рубце и продуктивность. В рубце коров, получавших жом, стабилизируется кислотность (рН), а в структуре ЛЖК увеличивается количество уксусной на 6,0%, синтез микробного белка на 33,6%, продуктивность на 1,7%, и не снижается уровень рентабельности производства молока в хозяйстве.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лапотко, А.М. Производству комбикормов – новые ориентиры / А.М. Лапотко, А.Л. Зинюченко // Белорусское сельское хозяйство: ежемесячный научно-практический журнал. – 2008. – № 11. – 27-31 с.
2. Лобас, Т. Предприятия сахарной отрасли Беларуси готовы к переработке сахарной свеклы нового урожая / Т. Лобас // БЕЛТА [Электронный ресурс]. – 2009. – Режим доступа: <http://www.21.by/news/?id=436056> – Дата доступа: 02.02.2010.
3. Мирошниченко, В.А. Эффективность использования заменителей зерна в комбикормах при выращивании ремонтных телок: Молочно-мясное скотоводство, 1989; Т. 75. – 60-63 с.
4. Хотмирова, О.В. Процессы пищеварения у коров при разном уровне клетчатки в рационе / Харитонов Е.Л., Хотмирова О.В. / Актуальные проблемы заготовок, хранения и рационального использования кормов. Мат. меж. научно-практ. конф. Посвященной 100-летию д.б.н., профессора С.Я. Зафрена, – М.: ФГУ РЦСК 2009. – 181-189 с.
5. Чепелев, Н.А. Использование свекловичного жома в рационах дойных коров / Н.А. Чепелев, А.А. Зорикова, О.Н. Егорчева // Наука и инновации в сельском хозяйстве, Ч.3 – Курск: Курская государственная сельскохозяйственная академия, 2011. – 32-34 с.

УДК 636.2.034.636.087.7

ТРАНСДУКЦИЯ КАЛЬЦИЯ В СПЕРМАТОЗОИДАХ БЫКОВ ПРИ АКРОСОМНОЙ РЕАКЦИИ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ПРОЛАКТИНА И ГТФ

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

ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных,
г. Санкт-Петербург–Пушкин, Россия

(Поступила в редакцию 08.07.2014 г.)

Аннотация. Для оценки колебаний внутриклеточного кальция сперматозоидов быков на спектрофлуориметре после воздействия ГТФ и пролактина использовали флуоресцентный зонд хлоротетрациклин (ХТЦ). Было доказано, что совместное действие ГТФ и пролактина вызывает дополнительную мобилизацию кальция из внутриклеточных депо (ВД) спермиев. Эксперименты с применением специфического ингибитора Ca^{2+} -АТФазы тапсигаргина, мобилизующего кальций из IP_3 -чувствительных ВД, продемонстрировали, что пролактин воздействует на IP_3 -

чувствительные ВД кальция, а ГТФ – на IP_3 -нечувствительные. После ряда экспериментов с использованием ингибитора микротрубочек нокодазола было доказано, что микротрубочки принимают участие в перемещении кальция между ВД под воздействием ГТФ и пролактина. Для оценки акросомной реакции в сперматозоидах быков использовали окраску клеток с помощью 200 мкМ раствора ХТЦ. Доказано, что в образцах, обработанных совместно ГТФ и пролактином, процент клеток на стадии акросомной реакции достоверно выше, чем в контрольном образце. Таким образом, в процессе индукции акросомной реакции происходит перемещение кальция между IP_3 -чувствительными и IP_3 -нечувствительными ВД сперматозоидов.

Summary. Fluorescent probe chlortetracycline was used for assessment the intracellular calcium oscillations in the sperm of bulls after impact of GTP and prolactin. It was shown that the combined effect of GTP and prolactin causes additional mobilization of calcium from intracellular stores in sperm. Experiments with the use of thapsigargin (specific inhibitor of Ca^{2+} -ATPase), which are mobilizing calcium from IP_3 -sensitive intracellular stores demonstrated that prolactin acts on IP_3 -sensitive intracellular stores calcium and GTP - on IP_3 -insensitive. After a series of experiments using a microtubule inhibitor nocodazole was shown that microtubules are involved in the transduction of calcium between intracellular stores after the influence of GTP and prolactin. Chlortetracycline (200 μ M) was used for evaluation of acrosome reaction by staining cells. It has been shown that in samples treated together by GTP and prolactin, the percentage of cells in stage of acrosome reaction is significantly higher than the control sample. Thus, during the induction of acrosome reaction occurs the transduction of calcium between IP_3 -sensitive and IP_3 -insensitive intracellular stores in spermatozoa.

Введение. Акросомная реакция, которая приводит к экзоцитозу акросомных пузырьков, является важным шагом для оплодотворения. В сперматозоидах млекопитающих акросомная реакция начинается в естественных условиях при связывании спермия с зоной пеллюцида яйцеклетки, и только мужская гамета, которая способна завершить акросомную реакцию, может проникнуть в ооцит [1].

Для прохождения акросомной реакции не требуется внеклеточный кальций. В сперматозоидах мышей в отсутствие внеклеточного Ca^{2+} , в присутствии ЭГТА тапсигаргин стимулирует освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо, что в свою очередь приводит к акросомной реакции [2].

Мобилизация Ca^{2+} из акросомы и внутриклеточных депо в районе шеи и средней части регулируют разные внутриклеточные функции. Взаимодействие сперматозоида с блестящей оболочкой активирует каскады сигнализации, ведущие к акросомному экзоцитозу [3]. Весьма вероятно, что те спермии, которые претерпевают преждевременную акросомную реакцию, могут иметь серьезные проблемы со способностью к оплодотворению. Поэтому очень важно, чтобы сигналы, которые мобилизуют Ca^{2+} , хранящийся в районе средней части/шеи и используемый для регулирова-

ния подвижности, не могли случайно активировать акросомные депо. В сперматозоидах человека, стимулированных прогестероном, увеличение колебаний кальция в шее и, как следствие регулирования деятельности жгутиков, не вызывает детектируемое появление акросомной реакции [4]. Кроме того, на спермиях хомька было показано, что у гиперактивированных сперматозоидов концентрация Ca^{2+} возросла в большей степени в средней части, чем в головке, тогда как в акросома-реактивных спермиях – наоборот [5].

Полученные в разных лабораториях результаты предполагают, что первое переходное увеличение цитозольного кальция, вероятно, опосредуется кальциевыми каналами Т-типа и приводит ко второму устойчивому росту цитозольного кальция, который является необходимым для акросомной реакции [6; 7]. Хотя связь между этими двумя событиями не совсем ясна, существует гипотеза, что первое повышение кальция вызывает активацию фосфолипазы С. Этот фермент образует IP_3 , тем самым мобилизуя Ca^{2+} из внутриклеточных депо акросомы спермы, хотя объем этих внутриклеточных депо весьма ограничен [7]. Опустошение этих внутриклеточных депо вызывает открытие депо-опосредованных кальциевых каналов в плазматической мембране, вызывающих второй и устойчивый рост концентрации внутриклеточного кальция, что приводит к акросомному экзоцитозу [8].

В настоящее время активно ведутся исследования механизмов кальциевой сигнализации сперматозоидов, играющей ключевую роль в процессе капацитации, акросомной реакции и гиперактивации, необходимых для успешного оплодотворения. Доказано присутствие в спермиях внутриклеточных депо кальция и установлено, что они способны генерировать в клетке Ca^{2+} -сигналы, которые различаются по размеру, форме и расположению внутри клетки, обеспечивая локальный контроль различных Ca^{2+} -регулируемых функций. Как происходит увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , необходимого для прохождения процессов капацитации, гиперактивации и акросомной реакции, до сих пор полностью не ясно. Только в последние несколько лет начались исследования взаимодействий между различными внутриклеточными депо кальция и получены данные, показывающие, что такое взаимодействие может способствовать дополнительному усложнению пространственно-временной внутриклеточной кальциевой сигнализации [9]. Текущие исследования направлены на идентификацию этих взаимодействий и оценку их роли в контроле сложных физиологических процессов.

Цель работы – выявить и охарактеризовать пути трансдукции кальция в сперматозоидах быков при акросомной реакции после воздействия пролактина и ГТФ.

Материал и методика исследований. В своей работе мы использовали свежую сперму, которую получали в день эксперимента на племенном предприятии «Невское» у быков айрширской и голштинской пород с помощью искусственной вагины. В каждом эксперименте использовался эякулят трех разных быков. Из каждой порции брали по 200 мкл семени, таким образом работали далее с 600 мкл спермы. Все манипуляции проводились с использованием термостолика во избежание холодового шока сперматозоидов.

Клетки отмывали от семенной плазмы двукратным центрифугированием при 1800 об./мин. и 0,3 г в течение 10 минут среде Sp-TALP, состоящей из 100 mM NaCl, 3,1 mM KCl, 25 mM NaHCO₃, 0.3 mM NaH₂PO₄, 21.6 mM Lactate (sodium salt), 2 mM CaCl₂, 0.4 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 1 mM пирувата и 0,1 поливинилалкоголя, pH которой составлял 7,4-7,45. Далее такая же среда, но без поливинилалкоголя и с добавлением БСА в концентрации 6 мг/мл (TALP для капацитации), использовалась для приготовления раствора хлортетрациклина (ХТЦ). Измерение в сперматозоидах интенсивности флуоресценции проводили на спектрофлуориметре "Hitachi" с использованием хлортетрациклина (ХТЦ) в концентрации 200 мкМ. Время нагрузки зондом составляло 30 мин при 39⁰ С и 5% CO₂, после чего клетки отмывали в среде TALP без поливинилалкоголя, с добавлением БСА. Измерения производили в среде без Ca²⁺, с добавлением ЭГТА в концентрации 0,5 mM и БСА в концентрации 1 мг/мл. Величина длины волны возбуждения и излучения для ХТЦ – 390 и 530 нм, соответственно, при ширине щели 10 нм. Интенсивность флуоресценции измерялась в условных единицах.

Для работы на люминесцентном микроскопе готовили препараты, окрашенные раствором хлортетрациклина (ХТЦ, 750 мкМ). Раствор ХТЦ готовили в буфере, который содержит 130 mM NaCl, 5 mM L-цис-теина, 20 mM Трис (pH 7.8). Раствор готовили непосредственно перед экспериментом и хранили в темноте при 4⁰С. 20 мкл суспензии спермы и 20 мкл раствора ХТЦ смешивали и инкубировали при 39⁰С в течение 10 мин. Затем в эту смесь для фиксации добавляли 10 мкл глутаральдегида в концентрации 0.1%. При этой концентрации глутаральдегида флуоресценция остается стабильной в течение 2 часов и не оказывается влияния на клетки [10]. После этого при комнатной температуре каплю суспензии спермы (10 мкл) размещали на предметном стекле и смешивали с 10 мкл 0.22 М 1,4-дiazобисциклооктана, растворенного в глицерол/PBS (9:1, v/v). Образцы накрывали покровным стеклом, которое закрепляли с помощью бесцветного лака для ногтей. Препараты до момента наблюдения хранили в темноте при 4⁰С. Сперматозоиды (200 шт. на стекло в дубликатах) наблюдали с помощью микроскопа Zeiss AXIO imager.A1. Сперму оцени-

вали в соответствии с одним из трех типов окрашивания [11]: равномерная флуоресценция во всей головке (некапацитированные клетки), свободная от флуоресценции полоса в постакросомальном районе (капацитированные клетки), низкая флуоресценция во всей головке, за исключением тонкой яркой полосы флуоресценции в экваториальном сегменте (акросома-реактивные клетки).

Акросомную реакцию индуцировали с помощью препарата лизофосфатидилхолина (LPC) [12], который добавлялся к сперме после 4 часов инкубации в среде для капацитации. Конечная концентрация LPC в образцах со спермой составляет 100 мкг/мл, время инкубации – 30 мин при 39 °С, 5% CO₂ и 95% влажности.

Результаты исследований и их обсуждение. После проведения ряда экспериментов на спектрофлуориметре «Hitachi» с применением тапсигаргина было выявлено, что пролактин воздействует на IP₃-чувствительные ВД кальция, а ГТФ – на IP₃-нечувствительные. Это удалось установить благодаря особым свойствам тапсигаргина, который является специфическим ингибитором Ca²⁺-АТФазы. Мишенью для тапсигаргина является система аккумуляции Ca²⁺, и в значительно меньшей степени система высвобождения этого иона (Thastrup et al., 1990). Тапсигаргин преимущественно освобождает Ca²⁺ из тех внутриклеточных депо, на поверхности которых находятся рецепторы к инозитол-1,4,5-трифосфату (Thastrup et al., 1990). Таким образом, использование тапсигаргина позволяет определить, на какой тип ВД кальция – IP₃-чувствительные или IP₃-нечувствительные – действует тот или иной реагент; т. к. тапсигаргин опустошает IP₃-чувствительные депо, то при действии соединения, активирующего мобилизацию Ca²⁺ из этих депо, не будет происходить детектируемое освобождение кальция из ВД. В наших экспериментах перед проведением измерений на спектрофлуориметре мы в течение 10 мин обрабатывали клетки тапсигаргином в концентрации 5 мкМ. При добавлении к клеткам, предварительно обработанным тапсигаргином, ГТФ вызывал выход Ca²⁺ из ВД, тогда как при добавлении пролактина к гаметам, подвергшимся воздействию ингибитора, спектрофлуориметр не фиксировал мобилизации Ca²⁺ из ВД сперматозоидов. Полученные данные в графическом виде представлены на рисунке 1.

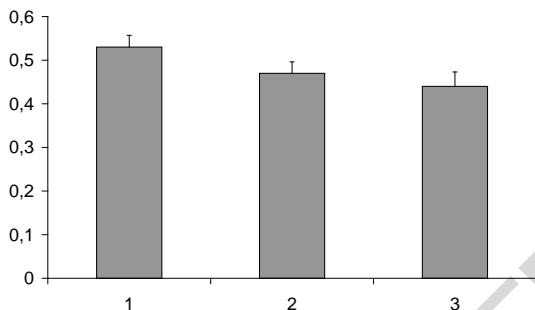


Рисунок 1 – Влияние тапсигаргина на стимулированную пролактином и ГТФ мобилизацию Ca^{2+} из внутриклеточных депо сперматозоидов быков

По горизонтали: 1 – контрольные клетки (обработаны тапсигаргином в концентрации 5 мкМ); 2 – активация пролактином в концентрации 10 нг/мл; 3 – действие ГТФ в концентрации 10 мкМ. По оси ординат – интенсивность флуоресценции ХТЦ, усл. ед. Различия достоверны при $P < 0.05$ [1 и 3]

В следующей серии исследований эксперименты также проводили на спектрофлуориметре "Hitachi". Добавляя к сперматозоидам поочередно ГТФ и пролактин и сравнивая интенсивность флуоресценции ХТЦ после добавления одного или обоих реагентов с контролем (к которому добавлялось равное количество среды TALP), мы сделали вывод, что при совместном действии пролактина и ГТФ происходит дополнительная мобилизация кальция из ВД спермиев. Так как данные вещества способны воздействовать на различные типы ВД кальция, предположительно, здесь мы имеем дело с перемещением кальция из IP_3 -нечувствительных в IP_3 -чувствительные ВД спермиев. Нами также была выявлена роль микротрубочек в данном типе перемещения кальция, для чего мы использовали ингибитор полимеризации микротрубочек нокодазол. При внесении в среду с клетками за 30 мин до проведения измерений этого ингибитора дополнительная мобилизация кальция при совместном воздействии пролактина и ГТФ подавлялась. Это свидетельствует о том, что микротрубочки принимают участие в данном типе взаимодействия ВД кальция сперматозоидов быков. Результаты данной серии экспериментов отражены в таблице.

Таблица – Влияние ингибитора полимеризации микротрубочек на стимулированное пролактином и ГТФ освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо сперматозоидов быков в среде без кальция

Условия эксперимента (воздействующее вещество)	Интенсивность флуоресценции комплекса хлортетрацилин-мембрана- Ca^{2+} в спермиях быков (усл. ед.)	
	Контроль (К)	К + ингибитор полимеризации

		микротрубочек нокодазол (10 мкМ)
Контроль	0,78±0,050 ^a	0,74±0,028 ^k
Пролактин, 10 нг/мл	0,56±0,029 ^b	0,61±0,037 ^l
ГТФ, 10 мкМ	0,56±0,027 ^c	0,61±0,043 ^m
Пролактин + ГТФ	0,48±0,018 ^d	0,58±0,025 ⁿ

^{a,b}, ^{a,c} - $P < 0,001$, ^{d,n} - $P < 0,01$, ^{b,d}, ^{c,d} - $P < 0,05$

Далее нами были проведены эксперименты, которые позволили установить связь между перемещением кальция под воздействием пролактина и ГТФ и акросомной реакцией сперматозоидов быков. Данные были получены подсчетом около 1000 клеток для каждого образца, наблюдаемого под микроскопом Zeiss AXIO imager.A1. Было выявлено, что пролактин в паре с ГТФ способен стимулировать акросомную реакцию: в образцах, к которым перед инкубацией добавляли эти два реагента, наблюдалось увеличение доли клеток на стадии акросомной реакции относительно контроля (куда добавлялась только среда TALP); также различие достоверно и для образцов, куда пролактин и ГТФ добавлялись по отдельности. Обнаружено участие в процессе акросомной реакции микротрубочек и протеинкиназы С. Об этом свидетельствуют данные, полученные при оценке образцов, куда перед инкубацией помимо пары пролактин/ГТФ добавлялся ингибитор полимеризации микротрубочек нокодазол или ингибитор протеинкиназы С Ro 31-8220: наблюдалось снижение количества спермиев на стадии акросомной реакции в случае использования каждого из этих двух ингибиторов. Результаты экспериментов отражены на рисунке 2.

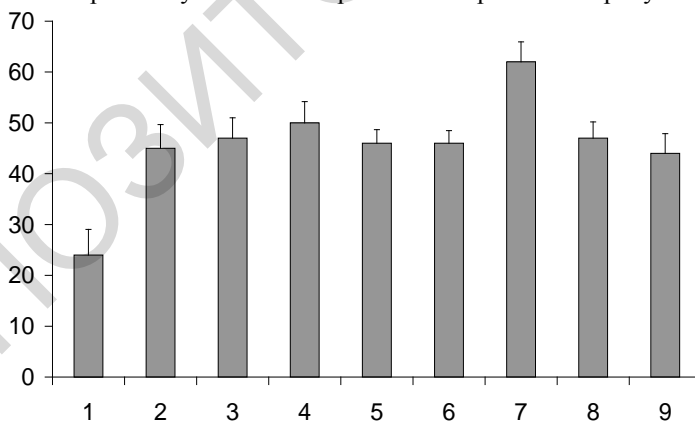


Рисунок 2 – Влияние пролактина и ГТФ на акросомную реакцию сперматозоидов быков (все клетки обработаны LPC).

По горизонтали: 1 – контрольные клетки на 0 часов; 2 – контрольные клетки через 4 часа инкубации (K4); 3 – K4 совместно с ингибитором полимеризации микро-

трубочек нокодазолом; 4 – K4 совместно с ингибитором протеинкиназы C Ro 31-8220; 5 – действие 10 мкМ ГТФ; 6 – активация пролактином в концентрации 10 нг/мл; 7 – совместное действие пролактина и ГТФ; 8 – нокодазол (10 мкМ) и последующее совместное действие пролактина и ГТФ; 9 – Ro 31-8220 (2 мкМ) и последующее совместное действие пролактина и ГТФ. По оси ординат – процент сперматозоидов на стадии акросомной реакции. Различия достоверны при $P < 0.001$ [6 и 7], $P < 0.01$ [5 и 7; 7 и 8; 7 и 9]

Заключение. Таким образом, результаты работы свидетельствуют о том, что стимулированная пролактином и ГТФ акросомная реакция сперматозоидов быков связана с перемещением Ca^{2+} , предположительно, из IP_3 -нечувствительных в IP_3 -чувствительные ВД спермиев, которое регулируется при участии микротрубочек и протеинкиназы C.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wassarman P.M., Jovine L., Litscher E.S. A profile of fertilization in mammals. *Nat. Cell Biol.* 2001. – 3: 59-64 p.
2. Herrick S.B., Schweissinger D.L., Kim S.W., Bayan K.R., Mann S., Cardullo R.A. The acrosomal vesicle of mouse sperm is a calcium store. *J. Cel. Physiol.* 2005. – 202: 663-671 p.
3. Florman H.M., Jungnickel M.K., Sutton K.A. Regulating the acrosome reaction. *Inter. J. Devel. Biol.* 2008. – 52: 503-510 p.
4. Harper C.V., Barratt C.L., Publicover S.J. 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.* 2004. – 279: 46315-46325 p.
5. Suarez S.S., Dai X. Intracellular calcium reaches different levels of elevation in hyperactivated and acrosome-reacted hamster sperm. *Mol. Reprod. Devel.* 1995. – 42: 325-333 p.
6. O'Toole C.M., Arnoult C., Darszon A., Steinhart R.A., Florman H.M. Ca^{2+} entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction. *Mol. Biol. Cell.* 2000. – 11: 1571-1584 p.
7. Rossato M., Di Virgilio F., Rizzuto R., Galeazzi C., Foresta C. Intracellular calcium store depletion and acrosome reaction in human spermatozoa: role of calcium and plasma membrane potential. *Mol. Hum. Reprod.* 2001. – 7: 119-128 p.
8. Darszon A., Beltrón C., Felix R., Nishigaki T., Trevico C.L. Ion transport in sperm signaling. *Dev. Biol.* 2001. – 240: 1-14 p.
9. Michelangeli F., Ogunbayo O.A., Wootton L.L. A plethora of interacting organellar Ca^{2+} stores. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2005. – 17: 135-140 p.
10. Ward C.R., Storey B.T. Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay. *Dev. Biol.* 1984. – 104: 287-296 p.
11. Fraser L.R., Abeydeera L.R., Niwa K. Ca^{2+} -regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis. *Mol. Reprod. Dev.* 1995. – 40: 233-241 p.
12. Parrish J.J., Susko-Parrish J., Winer M.A. First N.L. 1988. – Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.* 38: 1171-1180 p.

УДК: 619:614.9:636.2

ОБОСНОВАНИЕ УСЛОВИЙ СОДЕРЖАНИЯ КОРОВ В ПОМЕЩЕНИЯХ ОБЛЕГЧЕННОГО ТИПА