

КОФЕИН ПОВЫШАЕТ ЧИСЛО ЖИЗНЕСПОСОБНЫХ СПЕРМАТОЗОИДОВ БЫКОВ ПОСЛЕ РАЗМОРАЖИВАНИЯ

И. В. ЧИСТЯКОВА, младший научный сотрудник лаборатории биологии развития,
Т. И. КУЗЬМИНА, доктор биологических наук, профессор,
заведующая лабораторией биологии развития,
В. Ю. ДЕНИСЕНКО, доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник лаборатории биологии развития,
Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал Федерального научного центра животноводства –
ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста (ВНИИГРЖ)
(196601, г. Санкт-Петербург, г. Пушкин, Московское шоссе, д. 55а; тел.: 8 (812) 451-71-15)

Ключевые слова: жизнеспособность, заморозка, сперматозоиды быков.

Ранее было показано, что предварительная инкубация сперматозоидов перед замораживанием в присутствии соединений, способствующих капацитации (dbcAMP, теофиллин), повышает число жизнеспособных клеток после размораживания [1]. В данной работе предварительную инкубацию сперматозоидов перед заморозкой проводили в присутствии соединений, активирующих капацитацию (кофеин) и не влияющих на этот процесс (ПРЛ и ГТФ). Оценку жизнеспособности сперматозоидов проводили с использованием флуоресцентного красителя пропидиума иодида, позволяющего по изменению окраски клеток разделять их на живые и мертвые. Было показано, что инкубация интактных сперматозоидов без последующего замораживания в среде без добавок в присутствии кофеина в концентрации 2 мМ, а также при совместном действии пролактина (ПРЛ) и ГТФ в концентрации 10 нг/мл и 10 мкМ соответственно не оказывала влияния на соотношение числа живых и мертвых клеток. Во всех вариантах экспериментов число живых сперматозоидов быков превышало количество мертвых клеток примерно в 3 раза. В сперматозоидах быков, которые перед заморозкой инкубировали в течение 4 часов без вышеуказанных реагентов, после размораживания соотношение количества живых и мертвых клеток составило 1:1. Предварительная инкубация сперматозоидов перед замораживанием в присутствии кофеина после размораживания/оттаивания обеспечила увеличение числа жизнеспособных сперматозоидов и снижение количества мертвых клеток. При инкубации сперматозоидов в течении 4 часов перед криоконсервацией в присутствии ПРЛ и ГТФ, замораживании и последующем оттаивании клеток число жизнеспособных клеток не изменилось. Таким образом, предварительная инкубация сперматозоидов перед криоконсервацией с кофеином, обеспечивающая увеличение числа капацитированных клеток, приводит к росту числа жизнеспособных сперматозоидов после размораживания.

THE CAFFEINE INCREASES THE NUMBER OF VIABLE BOVINE SPERMATOOZOA AFTER THAWING

I. V. CHISTIYAKOVA, junior researcher of laboratory of developmental biology,
T. I. KUZMINA, doctor of biological sciences, professor, the head of laboratory of developmental biology,
V. Yu. DENISENKO, doctor of biological sciences, the leading researcher of laboratory of developmental biology,
All-Russian Research Institute of Genetics and Breeding of Farm Animals –
the branch of the Federal Research Center for Livestock – ARIL named after academician L. K. Ernst (ARRIGBA)
(55a Moscow highway, 196601, Saint-Petersburg, Pushkin; phone: 8 (812) 451-71-15)

Keywords: viability, freezing, bovine spermatozoa.

Previously, it was shown that pre-incubation of spermatozoa before freezing in the presence of compounds providing capacitation (dbcAMP, theophylline) increases the number of viable cells after thawing [1]. In this study, pre-incubation of spermatozoa before freezing was carried out in the presence of compounds that activating capacitation (caffeine) and do not affect this process (PRL and GTP). The evaluation of the sperm viability was carried out with using of fluorescent dye propidium iodide, which allows to divide cells into live and dead by changing of cell color. It was shown that the incubation of intact spermatozoa without subsequent freezing in medium without any additives, or in the presence of caffeine (2 mM), as well as with addition of 10 ng / ml prolactin (PRL) and 10 μM guanosine triphosphate (GTP) did not affect the proportion of living and dead cells. In all variants of the experiments, the number of live spermatozoa of bulls exceeded the number of dead cells about 3 times. In spermatozoa, which were incubated for 4 hours before freezing without the above reagents, the ratio of live / dead cells was 1:1 after thawing. Pre-incubation of sperm cells before freezing in the presence of caffeine after freezing/thawing provided the increase in the number of viable spermatozoa and the decrease in the number of dead cells. Incubation of sperm for 4 hours before freezing in the presence of PRL and GTP, the freezing and the subsequent thawing the number of living and dead cells did not change. Thus, the incubation of cells with caffeine before cryopreservation providing the rise of capacitated cells leads to the increase in the number of viable spermatozoa after thawing.

Положительная рецензия представлена В. П. Терлецким, доктором биологических наук, профессором кафедры естествознания и географии Ленинградского государственного университета им. А. С. Пушкина.

Цель и методика исследований

Возрастающий интерес в повышении качества замороженной спермы быков в последние годы был определен снижением плодовитости молочных коров [3, 9]. Замораживание и оттаивание спермы быков приводит к уменьшению процента жизнеспособных клеток примерно до 50–60 % [7]. Поэтому при использовании замороженной спермы требуется увеличение концентрации мужских гамет, необходимой для оплодотворения, более чем в три раза, чтобы достичь показателей эффективности осеменения замороженной спермой [8].

Известно, что процесс замораживания/оттаивания спермы не только приводит к деструктивным изменениям липидного состава мембраны, но и к снижению подвижности сперматозоидов и их жизнеспособности, деструкции ДНК [11]. Особенности клеточной структуры сперматозоидов и их плазматической мембраны, низкая активность антиоксидантной системы сперматозоидов делают их уязвимыми для свободных радикалов, которые в большом количестве образуются во время процесса криоконсервации [10].

Добавление холестерина в криопротекторы улучшает способность спермы к криоконсервации за счет сохранения целостности мембраны и гидрофобности, уменьшения осмотического стресса [5]. Было показано, что БСА (бычий сывороточный альбумин) увеличивает подвижность и жизнеспособность сперматозоидов после длительного хранения при низких температурах [6]. Таким образом, совершенствование криосред позволило бы повысить эффективность криоконсервации спермы.

Целью работы явилось изучение влияния кофеина на жизнеспособность интактных и размороженных сперматозоидов быков. Использование кофеина было связано с необходимостью активации в сперматозоидах быков процессов капацитации [2], в то время как совместное действие ПРЛ и ГТФ приводило к активации акросомной реакции [4].

В экспериментах использовали свежие эякуляты от трёх разных быков чёрно-пёстрой породы. Для удаления семенной плазмы спермиев отмывали двумя последовательными центрифугированиями в течение 10 минут при 300 g в среде Sp-TALP, которая состояла из 100 mM NaCl, 3,1 mM KCl, 25 mM NaHCO₃, 0,3 mM NaH₂PO₄, 21,6 mM лактата натрия, 0,5 mM CaCl₂, 0,4 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 1 mM пирувата натрия и 0,1 % поливинилалкоголя. Инкубация спермы экспериментальных групп проводилась в среде Sp-TALP с 6 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (БСА) без или в присутствии различных добавок: 2 mM кофеина, 10 нг/мл пролактина (ПРЛ) и 10 мкМ гуанозинтрифосфата (ГТФ). Клетки инкубировались при 38 °C в атмосфере 5 % CO₂, 95 % влаж-

ности в течение 4 часов. Для замораживания эякулят быков смешивали с разбавителем в соотношении 1:1 при 27 °C и охлаждали до 18–22 °C. Затем проводили итоговое разбавление, фасовку и эквипирацию (экспозиция при 4 °C в течение 3–4 часов). Сперматозоидов замораживали в течение 7,5 минут до температуры –145 °C. Контейнер с образцами помещали в жидкий азот (–196 °C). Соломины со спермой размораживали на водяной бане (38,5 °C) в течение 1 мин.

Число погибших и живых клеток определяли по стандартной методике с использованием 0,06 % раствора пропидиума иодида. Для подсчёта использовали микроскоп AxioLab. A1 (Carl Zeiss) с фазовым контрастом и эпифлуоресцентной оптикой (при возбуждении 535 нм и излучении –617 нм). Сперматозоиды, имеющие яркую флуоресценцию всей головки, оценивались как мертвые, имеющие слабо окрашенную головку – как живые.

Достоверность различий для 4–5 экспериментов оценивали с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты исследований

Одной из главных проблем в криобиологии является сохранение жизнеспособности при замораживании. Основным подходом, используемым для повышения выхода жизнеспособных клеток после замораживания, является улучшение качества криосред путем подбора криопротекторов. Однако получаемые результаты при этом достаточно скромные. Применение лучших протоколов криоконсервации позволяло пережить замораживание половине клеток исходно подвижной популяции [12]. Использование различных криопротекторов показало, что лучшие показатели подвижности и целостности мембран клетки были в сперматозоидах, при замораживании которых использовали глицерин [7]. Ранее нами на сперматозоидах быков было показано, что предварительная инкубация сперматозоидов перед замораживанием в присутствии соединений, активирующих капацитацию (dbcAMP, теофиллин), приводило к повышению числа жизнеспособных клеток после замораживания [1]. В данной работе предварительную инкубацию сперматозоидов перед заморозкой проводили в присутствии соединений, активирующих капацитацию (кофеин) и не влияющих на этот процесс (ПРЛ и ГТФ).

Данные о влиянии различных соединений на жизнеспособность интактных сперматозоидов быков показаны на рис. 1. Видно, что инкубация сперматозоидов в течение 4 часов в отсутствие добавок, а также в присутствии кофеина в концентрации 2 mM и совместном действии ПРЛ и ГТФ в концентрации 10 нг/мл и 10 мкМ соответственно не приводили к различиям в соотношении числа мертвых и живых клеток.

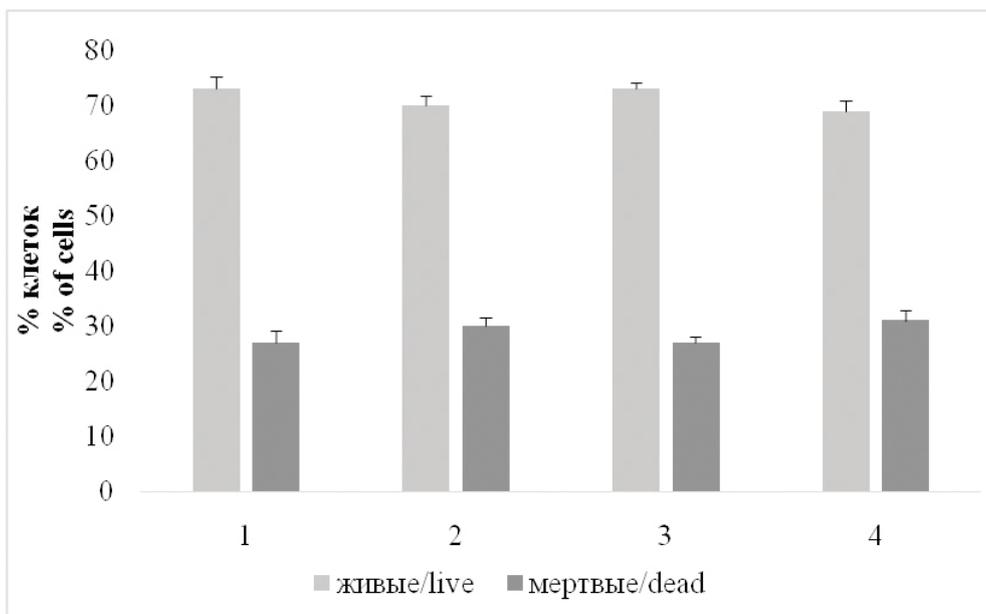


Рис. 1. Влияние различных соединений на жизнеспособность интактных сперматозоидов быков. По горизонтали: 1 – клетки без инкубации; 2 – клетки, инкубированные 4 ч без добавок (К); 3 – К + добавление кофеина в концентрации 2 мМ; 4 – К + совместное добавление ПРЛ и ГТФ в концентрации 10 нг/мл и 10 мкМ, соответственно

Fig. 1. The effect of various compounds on the viability of intact bovine spermatozoa. Horizontal: 1 – cells without incubation; 2 – cells incubated for 4 hours without additives (K); 3 – K + the addition of caffeine at a concentration of 2 mM; 4 – K + the addition of PRL and GTP at a concentration of 10 ng/ml and 10 μM, respectively

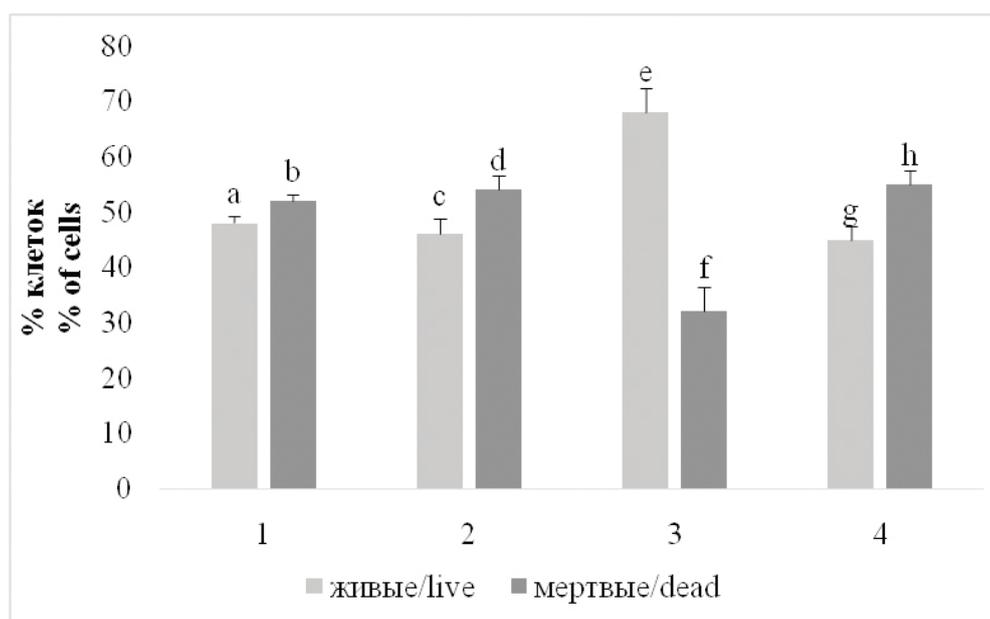


Рис. 2. Влияние предварительной капацитации сперматозоидов быков перед заморозкой на жизнеспособность клеток после размораживания. По горизонтали: 1 – клетки без инкубации; 2 – клетки, инкубированные 4 ч без добавок (К); 3 – К + добавление кофеина в концентрации 2 мМ; 4 – К + совместное добавление ПРЛ и ГТФ в концентрации 10 нг/мл и 10 мкМ соответственно. Различия достоверны при a:e; c:e; e:g; b:f; d:f; f:h P < 0,001

Fig. 2. The effect of preliminary capacitation of bovine spermatozoa before freezing on the cell viability after thawing. Horizontal: 1 – cells without incubation; 2 – cells incubated for 4 hours without additives (K); 3 – K + the addition of caffeine at a concentration of 2 mM; 4 – K + the addition of PRL and GTP at a concentration of 10 ng/ml and 10 μM, respectively. The differences are significant with a: e; c: e; e: g; b: f; d: f; f: h P < 0.001

Результаты экспериментов по идентификации характера влияния предварительной капацитации сперматозоидов быков в присутствии индукторов капацитации перед заморозкой на жизнеспособность этих клеток после размораживания представлены на рис. 2. Показано, что инкубация клеток в течение 4 ч без добавок, а также в присутствии ПРЛ и ГТФ

в концентрации 10 нг/мл и 10 мкМ соответственно не оказывала влияние на соотношение числа мертвых и живых клеток, которое в данном случае равнялось примерно 1:1. В то же время использование при предварительной инкубации кофеина в концентрации 2 мМ приводило к значительному увеличению числа жизнеспособных клеток после их размораживания.

Выводы. Рекомендации

1. Предварительная инкубация сперматозоидов быков в течение 4 часов в присутствии кофеина, а также совместное действие ПРЛ и ГТФ без последующей заморозки не влияли на соотношение числа живых и мертвых клеток во всех сериях проведенных экспериментов.

2. Предварительная инкубация в присутствии ПРЛ, ГТФ и кофеина до замораживания приводила к увеличению числа жизнеспособных клеток после размораживания, тогда как при совместном воздействии ПРЛ и ГТФ без использования кофеина вышеуказанного эффекта не наблюдали.

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

Литература

1. 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.
2. Денисенко В. Ю., Бойцева Е. Н., Кузьмина Т. И. Освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо сперматозоидов *Bos taurus* в зависимости от их функционального состояния // *Цитология*. 2015. Т. 57. № 3. С. 233–239.
3. Beran J., Stadnik L., Duchacek J., Okrouhla M., Dolezalova M., Kadlecova V., Ptacek M. Relationships among the cervical mucus urea and acetone, accuracy of insemination timing, and sperm survival in Holstein cows // *Animal Reproduction Science*. 2013a. No. 142. Pp. 28–34.
4. Breininger E., Cetica P. D., Beconi M. T. Capacitation inducers act through diverse intracellular mechanisms in cryopreserved bovine sperm // *Theriogenology*. 2010. V. 74. No. 6. Pp. 1036–1049.
5. Gürler H., Calisici O., Bollwein H. Inter- and intra-individual variability of total antioxidant capacity of bovine seminal plasma and relationships with sperm quality before and after cryopreservation // *Animal Reproduction Science*. 2015. No. 155. Pp. 99–105.
6. Chakrabarty P., Negi S., Andrés R. M., Favaro B. Facilitating conservation // *Science*. 2017. V. 6335 No. 356. Pp. 242–244.
7. 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 // *Andrologia*. 2012. No. 44. Pp. 154–159.
8. Meamar M., Shahneh A. Z., Zamiri M. J., Zeinoaldini S., Kohram H., Hashemi M. R., Asghari S. Preservation effects of melatonin on the quality and fertility of native Fars rooster semen during liquid storage // *Czech Journal of Animal Science*. 2016. No. 61. Pp. 42–48.
9. Stadnik L., Duchacek J., Beran J., Tousova R., Ptacek M. Relationships between milk fatty acids composition in early lactation and subsequent reproductive performance in Czech Fleckvieh cows // *Animal Reproduction Science*. 2015a. No. 155. Pp. 75–79.
10. Korkmaz F., Malama E., Siuda M., Leiding C., Bollwein H. Effects of sodium pyruvate on viability, synthesis of reactive oxygen species, lipid peroxidation and DNA integrity of cryopreserved bovine sperm // *Animal Reproduction Science*. 2017. No. 185. Pp. 18–27.
11. Zribi N. Effect of freezing-thawing process and quercetin on human sperm survival and DNA integrity // *Cryobiology*. 2012. No. 65. Pp. 326–331
12. Yang D. H., McMillan A. G., Standley N. T., Shannon P., Xu Z. Z. Extracellular calcium is involved in egg yolk-induced head-to-head agglutination of bull sperm // *Theriogenology*. 2012. V. 78. No. 7. Pp. 1476–1486.

References

1. Denisenko V. Yu., Kuzmina T. I., Boytseva E. N. Induction of the accumulation of *Bos taurus* spermatozoa before cryopreservation increases their viability after thawing // *Genes and cells*. 2018. T. XIII. No. 1. Pp. 86–91.
2. Denisenko V. Yu., Boytseva E. N., Kuzmina T. I. Ca^{2+} release from intracellular depots of *Bos taurus* spermatozoa depending on their functional state // *Tsitologiya*. 2015. T. 57. No. 3. Pp. 233–239.
3. Beran J., Stadnik L., Duchacek J., Okrouhla M., Dolezalova M., Kadlecova V., Ptacek M. Relationships among the cervical mucus urea and acetone, accuracy of insemination timing, and sperm survival in Holstein cows // *Animal Reproduction Science*. 2013a. No. 142. Pp. 28–34.
4. Breininger E., Cetica P. D., Beconi M. T. Capacitation inducers act through diverse intracellular mechanisms in cryopreserved bovine sperm // *Theriogenology*. 2010. T. 74. No. 6. Pp. 1036–1049.
5. Gürler H., Calisici O., Bollwein H. Inter- and intra-individual variability of total antioxidant capacity of bovine seminal plasma and relationships with sperm quality before and after cryopreservation // *Animal Reproduction Science*. 2015. No. 155. Pp. 99–105.

6. Chakrabarty P., Negi S., Andrés R. M., Favaro B. Facilitating conservation // *Science*. 2017. V. 6335 No. 356. Pp. 242–244.
7. 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 // *Andrologia*. 2012. No. 44. Pp. 154–159.
8. Meamar M., Shahneh A. Z., Zamiri M. J., Zeinoaldini S., Kohram H., Hashemi M. R., Asghari S. Preservation effects of melatonin on the quality and fertility of native Fars rooster semen during liquid storage // *Czech Journal of Animal Science*. 2016. No. 61. Pp. 42–48.
9. Stadnik L., Duchacek J., Beran J., Tousova R., Ptacek M. Relationships between milk fatty acids composition in early lactation and subsequent reproductive performance in Czech Fleckvieh cows // *Animal Reproduction Science*. 2015a. No. 155. Pp. 75–79.
10. Korkmaz F., Malama E., Siuda M., Leiding C., Bollwein H. Effects of sodium pyruvate on viability, synthesis of reactive oxygen species, lipid peroxidation and DNA integrity of cryopreserved bovine sperm // *Animal Reproduction Science*. 2017. No. 185. Pp. 18–27.
11. Zribi N. Effect of freezing-thawing process and quercetin on human sperm survival and DNA integrity // *Cryobiology*. 2012. No. 65. Pp. 326–331
12. Yang D. H., McMillan A. G., Standley N. T., Shannon P., Xu Z. Z. Extracellular calcium is involved in egg yolk-induced head-to-head agglutination of bull sperm // *Theriogenology*. 2012. V. 78. No. 7. Pp. 1476–1486.