

И. В. Чистякова, В. Ю. Денисенко, Т. И. Кузьмина

Эффект IBMX и пролактина на функциональное состояние криоконсервированных сперматозоидов быков

Аннотация.

Цель: изучение влияния IBMX (активатора фосфорилирования белков) и пролактина (ПРЛ) на функциональное состояние криоконсервированных сперматозоидов быков путём использования ингибиторного анализа.

Материалы и методы. В экспериментах использовали замороженно-оттаянную сперму 60 быков черной пёстрой породы. Для проведения капацитации клетки инкубировали в среде Sp-TALP с добавлением 6 мг/мл бычьего сывороточного альбумина и различных соединений: индуктором капацитации (IBMX в концентрациях 1 мкМ, 10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ), гормоном (ПРЛ в концентрациях 1 нг, 10 нг, 50 нг, 100 нг) и ингибиторами протеинкиназ С (Ro 31-8220 в концентрации 10 нг/мл) и протеинкиназы А (Н-89 в концентрации 10 мкМ). Инкубацию проводили при 38°C в атмосфере 5% CO₂, 98% влажности в течение 4 часов. Функциональный статус клеток определяли хлортетрациклиновым тестом.

Результаты. Показано, что все используемые концентрации IBMX не оказывали влияния на постэякуляционное созревание (капацитацию и акросомную реакцию) сперматозоидов, тогда как все концентрации ПРЛ (1–100 нг/мл) способствовали прохождению акросомной реакции в капацитированных клетках. В присутствии ингибитора протеинкиназы А отмечали уменьшение процента капацитированных и увеличение доли акросома-реактивных сперматозоидов при действии IBMX в концентрации 100 мкМ и отсутствие изменений при действии ингибитора протеинкиназы С. При ингибировании протеинкиназы С происходила отмена эффекта ПРЛ (в концентрации 10 нг/мл), оказываемого на сперматозоиды, в свою очередь использование Н-89 не влияло на функциональный статус сперматозоидов, опосредованный воздействием ПРЛ.

Заключение. На стадии капацитации все изученные концентрации IBMX не влияли на соотношение деконсервированных клеток с различным функциональным статусом. ПРЛ же способствовал прохождению акросомной реакции в капацитированных сперматозоидах после размораживания. Ингибирование протеинкиназы А при инкубации клеток с IBMX опосредовало протекание процессов акросомального экзоцитоза в капацитированных клетках и не влияло на этот процесс при действии ПРЛ, тогда как ингибитор протеинкиназы С изменял соотношение клеток с различным функциональным статусом в сторону увеличения процента клеток на стадии капацитации при действии ПРЛ и не участвовал во внутриклеточном действии, оказываемом IBMX на деконсервированные клетки.

Ключевые слова: капацитация, акросомная реакция, криоконсервация, сперматозоид, быки.

Авторы:

Чистякова Ирэна Валерьевна — кандидат биологических наук; e-mail: itjerena7@gmail.com;

Денисенко Виталий Юрьевич — доктор биологических наук; e-mail: den.vitaly2016@yandex.ru;

Кузьмина Татьяна Ивановна — доктор биологических наук, профессор; e-mail: prof.kouzmina@mail.ru.

«Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных — филиал ФГБНУ ФИЦ — ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста»; 196601, Россия, г. Санкт-Петербург, п. Тярлево, Московское ш., 55а.

Введение. Капацитация и акросомная реакция являются ключевыми процессами в приобретении сперматозоидом компетенции к оплодотворению яйцеклетки [1]. Известно, что капацитация спермы обусловлена реакциями фосфорилирования некоторых белков (ФБ) [2]. Более того, чем ак-

тивнее происходит реакция ФБ в сперматозоидах, тем выше их фертильность [3]. При замораживании мужских гамет интенсивность ФБ снижается, чем обусловлены снижение оплодотворяющей способности и низкий выход доимплантационных эмбрионов [3]. Таким образом, добавление

веществ, способствующих протеканию реакции ФБ, теоретически позволит повысить эффективность используемой в клеточных репродуктивных технологиях размороженной спермы. Одними из наиболее перспективных веществ, оказывающих влияние на регуляцию реакции ФБ, являются метильные производные ксантина (кофеин, теофиллин, 3-изобутил-1-метилксантин или IBMX) [4]. В основе действия метилксантинов лежит процесс подавления активности фосфодиэстеразы в клетках, вызывающее повышение внутриклеточного уровня цАМФ [5], приводящего к активации протеинкиназы А и, таким образом, протеканию каскада биохимических реакций, связанных с процессом капацитации. Показано, что добавление активаторов фосфорилирования (метилксантинов) к нативной сперме, таких как кофеин или IBMX, ингибирование протеинкиназы А блокировало реакции присоединения фосфатной группы к гидроксильной группе боковой цепи остатка тирозина [6], а, следовательно, снижало число капацитированных клеток. Таким образом, данный факт подтверждает ключевую роль протинкиназы А в реализации клеточных эффектов, оказываемых метильными производными ксантина на капацитацию. Однако вовлеченность данного фермента в процессы, протекающие в деконсервированных сперматозоидах в течении постэякуляционного созревания при действии ксантин-производных соединений, до сих пор остаётся неясной.

Пролактин (ПРЛ) является пептидным гормоном, который присутствует в семенной плазме и цервикальной слизи в достаточно высоких концентрациях [7] и участвует в кальций-зависимых процессах постэякуляционного созревания мужских гамет (капацитации и акросомной реакции) [8]. В наших более ранних работах также имеются сведения о том, что ПРЛ в паре с гуанозинтрифосфатом (ГТФ) способны стимулировать переход кальция в нативных сперматозоидах, опосредующий реакции акросомного экзоцитоза за счёт активации протеинкиназы С [9, 10]. Тем

ни менее влияние пролактина на кальций-зависимые процессы постэякуляционного созревания сперматозоидов крупного рогатого скота после процедуры криоконсервации и роль протеинкиназы С в регуляции этих механизмов требуют дальнейших исследований.

Цель — изучение действия IBMX и ПРЛ на функциональное состояние криоконсервированных сперматозоидов быков путём использования ингибиторного анализа.

Методы и методы. Материалом для экспериментов послужила сперма 60-ти быков чёрно-пёстрой породы крупного рогатого скота, криоконсервированная путём программного замораживания. Сперматозоиды после оттаивания извлекали из пайет, после чего отмывали от семенной плазмы и криопротекторов путем двух повторных центрифугирований в течение 10 минут при 500 g в среде Sp-TALP следующего состава: 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. Процесс капацитации спермы осуществляли в среде Sp-TALP с добавлением 6 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (БСА). Согласно схеме эксперимента, представленной на рисунке 1, в среды для капацитации опытных групп вносили индуктор капацитации (IBMX в концентрациях 1 мкМ, 10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ), гормон (ПРЛ в концентрациях 1 нг, 10 нг, 50 нг, 100 нг) и различные ингибиторы ферментов (ингибитора протеинкиназы С — Ro 31-8220 в концентрации 10 нг/мл и ингибитора протеинкиназы А — H-89 в концентрации 10 мкМ). Инкубацию проводили в CO₂-инкубаторе при 38°C в атмосфере 5% CO₂, в условиях максимальной влажности в течение 4 часов.

При выборе концентрации IBMX и пролактина руководствовались данными других исследователей [11]. По истечении времени экспозиции из каждого экспериментального образца отбирали по 20 мкл клеточной суспензии и смешивали

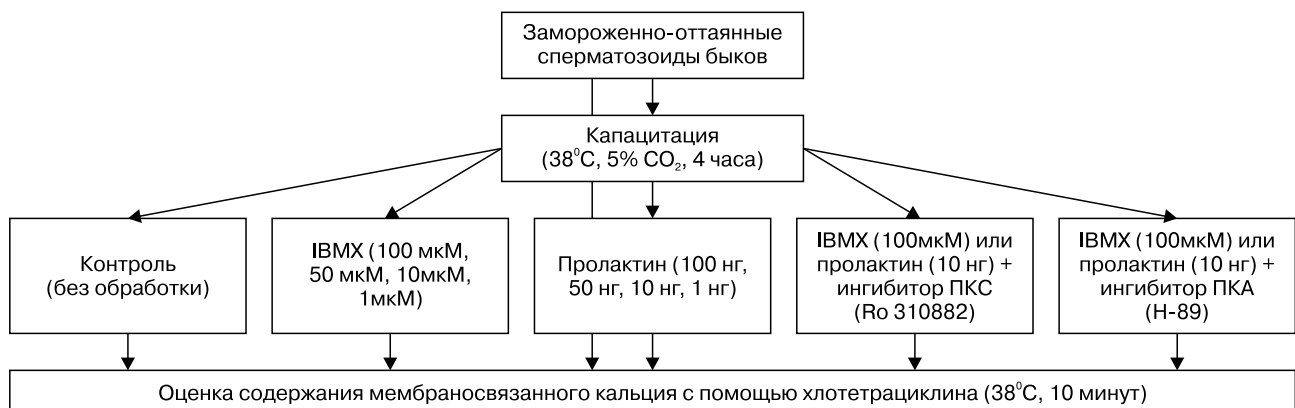


Рис. 1. Структурно-логическая схема эксперимента

с 20 мкл 750 мкМ раствора хлортетрациклина (ХТЦ), приготовленного на основе среды, содержащей 130 мМ NaCl, 5 мМ L-цистеина, 20 мМ Трис. Клетки выдерживали в растворе красителя в течение 10 мин при 38°C, после чего проводили фиксацию путем добавления 10 мкл 25% глутеральдегида в 1 мМ растворе Триса с конечной концентрацией глутеральдегида 0.1%.

Подсчёт проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Axio Imager 2A («Carl Zeiss», Германия). Длины волн возбуждения комплекса ХТЦ- Ca^{2+} -мембрана — 380–400 нм, излучения — 530 нм. Каждую из 200 клеток оценивали в соответствии с одним из трех типов флуоресценции ХТЦ (функциональный статус) [12]: клетки с равномерной флуоресценцией всей головки считались некапацитированными; сперматозоиды с наличием свободного от флуоресценции участка в постакросомальной зоне — капацитированными; клет-

ки с нефлуоресцирующей головкой, за исключением тонкой яркой полосы в экваториальном районе, характерной для акросома-реактивных клеток. Достоверность различий сравниваемых средних значений для 3–5 экспериментов оценивали с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты исследований и обсуждение. Крío-консервация провоцирует в сперматозоидах процессы, схожие с капацитацией (приток кальция, псевдоразжижение мембраны), именуемые так называемой «криокапацитацией» [13]. Также известно, что криогенная капацитация связана с тем, что после криоконсервации обнаруживается ряд фосфорилированных белков, специфичных для физиологической капацитации [14].

Результаты экспериментов по оценке локализации флуоресценции комплекса ХТЦ- Ca^{2+} -мембрана представлены на рисунке 2. Использование для инкубации криоконсервированных сперма-

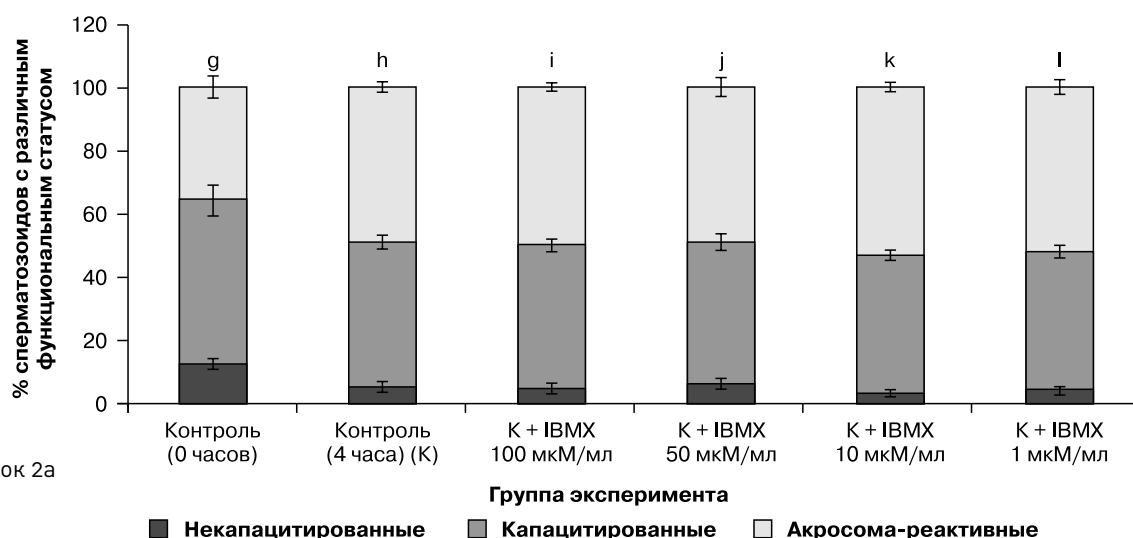


Рисунок 2а

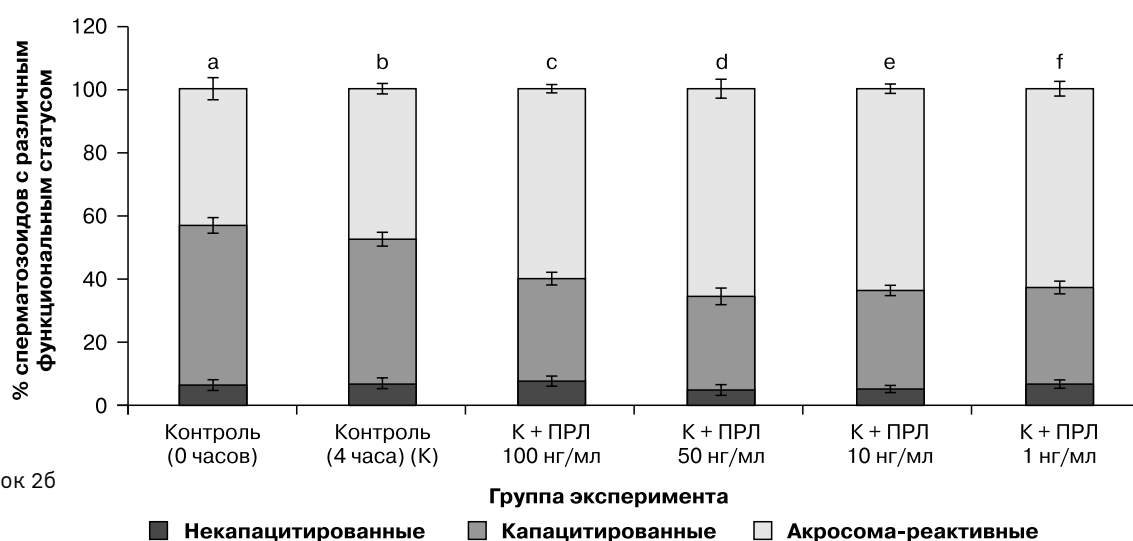


Рисунок 2б

Рис. 2. Влияние различных концентраций IBMX (а) и ПРЛ (б) в процессе капацитации на функциональное состояние замороженных сперматозоидов быков (общее число клеток — 7200; число экспериментов — 3). Различия достоверны (процентное соотношение капацитированных и акросома-реактивных сперматозоидов) при $p < 0.001$ для a:d; a:e; a:f; a:g; b:d; при $p < 0.01$ для b:e; g:k; g:l; при $p < 0.05$ для b:c; b:f; g:h; g:i; g:j (t-критерий Стьюдента)

тозоидов быков IBMX в концентрации от 1 до 100 мкМ или ПРЛ в диапазоне концентраций от 1 до 100 нг/мл показало, что все используемые концентрации IBMX не оказывали влияния на изменение соотношения клеток с различным функциональным статусом, тогда как добавление ПРЛ способствовало прохождению акросомной реакции в капацитированных сперматозоидах, причем эффект проявлялся при использовании ПРЛ в любой из 4 концентраций (рис. 2).

Влияние ингибиторов протеинкиназ А и С соединений Н-89 и Ро 31-8220 на процесс капацитации размороженных сперматозоидов быков показано на рис. 3. В контрольных клетках (в отсутствии ингибиторов протеинкиназ) ПРЛ в концентрации 10 нг/мл способствовал прохождению акросомной реакции в капацитированных сперматозоидах (65%) по сравнению с контрольными интактными клетками (54%), тогда как IBMX в концентрации 100 мкМ не влиял на процентное соотношение числа капацитированных и акросома-реактивных клеток (46%) относительно интактной группы. В присутствии ингибитора протеинкиназы А (Н-89) в концентрации 10 мкМ отмечали достоверное увеличение процента акросома-реактивных клеток после обработки IBMX (65%), в то же время ингибитор протеинкиназы С (Ро 31-8220) не оказывал влияние на процессы, связанные с прохождением акросомной реакции (47%) относительно клеток, проэкспонированных только с IBMX. При блокировке клеточных эффектов протеинкиназы С путём добавления Ро 31-8220 в процессе капацитации наблюдался ингибирующий эффект указанного соединения на стимулирующее действие ПРЛ (44%), в то время как ингибирование протеинкиназы А не влияло на ПРЛ-зависимые внутриклеточные процессы (66%).

Процедура криоконсервации подавляет процессы нормальной капацитации в сперматозоидах, в том числе за счёт снижения реакции ФБ [3]. Было показано, что IBMX повышает уровень ФБ в замороженно-оттаянной сперме крыс, что положительно сказывается на фертильности клеток и формировании пронуклеусов при оплодотворении ооцитов [3]. В интактной сперме человека IBMX способствует прохождению процесса капацитации, однако при обработке высокими концентрациями вызывает ингибирование ПКА-зависимой акросомной реакции [6]. Таким образом, экспозиция деконсервированных сперматозоидов с метиловым производным ксантина в концентрации 100 мкМ предположительно оказывает ингибирующий эффект на акросомную реакцию, который, однако, блокируется протеинкиназой А (рис. 4). Увеличение числа акросома-реактивных клеток при ингибировании протеинкиназы А, возможно, связано с запуском другого каскадного пути акросомной реакции. Как было показано, при ингибировании протеинкиназы А в нативной сперме человека активируется ПКА-независимая акросомная реакция через так называемый ЕРАС (exchange protein), стимулируемый непосредственно цАМФ [6].

Показано, что использование ПРЛ в процессе подготовки спермы мышей к оплодотворению приводило к сокращению времени, необходимому для прохождения процесса капацитации и последующей акросомной реакции [15]. Кроме того, как упоминалось ранее, ПРЛ-зависимое действие на акросомную реакцию в нативной сперме опосредовано участием протеинкиназы С [9]. Таким образом, полученные нами данные можно экстраполировать на ранее предложенную теорию участия протеинкиназы С в реализации эффектов ПРЛ

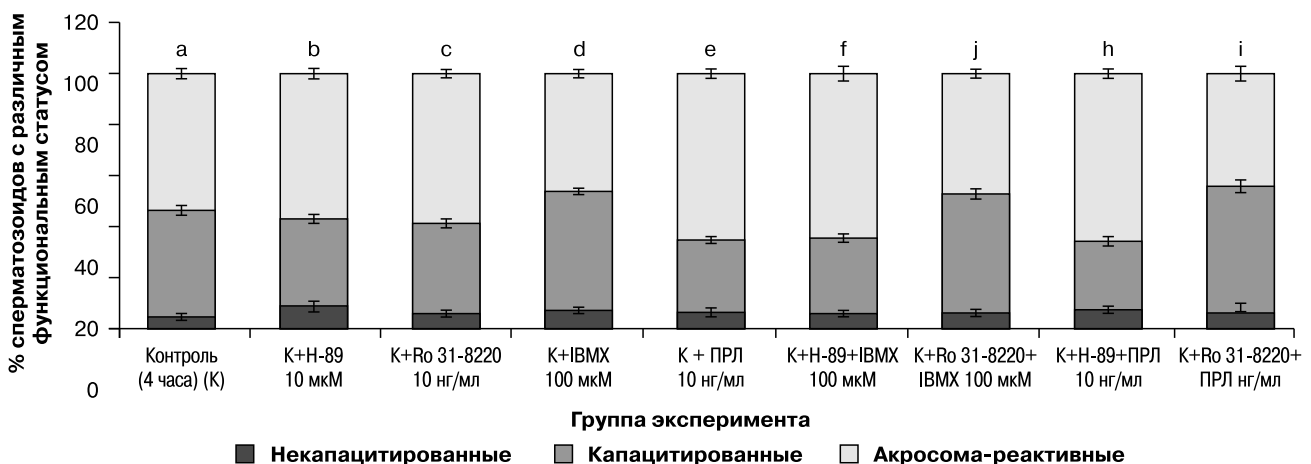


Рис. 3. Влияние ингибиторов протеинкиназ А и С на активированную IBMX и ПРЛ капацитацию в замороженных сперматозоидах быков (общее число клеток — 5400; число экспериментов — 3). Различия достоверны (процентное соотношение капацитированных и акросома-реактивных сперматозоидов) при $p < 0.001$ для a:h; c:d; d:e; d:f; d:h; e:j; e:i; f:j; f:i; j:h; h:i; при $p < 0.05$ для a:e; a:f; a:i; b:d; b:e; b:h; b:i; c:j; c:h; c:i (t-критерий Стьюдента)

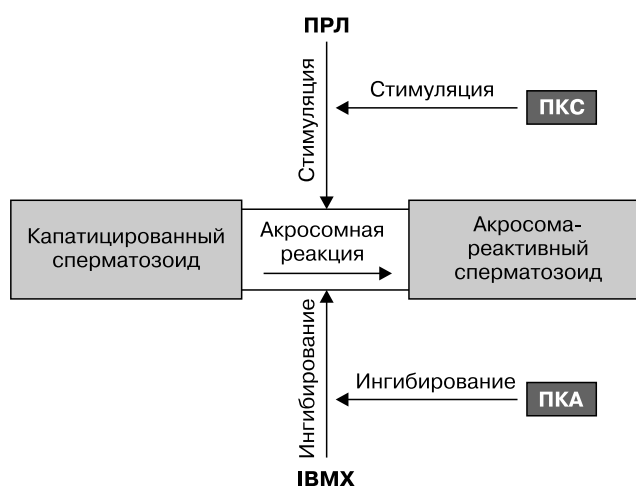


Рис. 4. Схема механизмов влияния IBMX и ПРЛ на функциональное состояние деконсервированных сперматозоидов быков. Ингибирующий эффект IBMX на акросомную реакцию ингибируется действием протеинкиназы А (ПКА), в то же время действие протеинкиназы С (ПКС) связано с прохождением акросомной реакции в деконсервированных сперматозоидах быков при действии ПРЛ

на постэякуляционное созревание, в частности на протекание реакции акросомального экзоцитоза в деконсервированных сперматозоидах быков (рис. 4).

Заключение. На стадии капацитации все изученные концентрации IBMX не влияли на соотношение деконсервированных клеток с различным функциональным статусом. ПРЛ же способствовал прохождению акросомной реакции в капацированных сперматозоидах после размораживания. Ингибирование протеинкиназы А при инкубации клеток с IBMX опосредовало протекание процессов акросомального экзоцитоза в капацированных клетках и не влияло на этот процесс при действии ПРЛ, тогда как ингибитор протеинкиназы С изменял соотношение клеток с различным функциональным статусом в сторону увеличения процента клеток на стадии капацитации при действии ПРЛ и не участвовал во внутриклеточном действии, оказываемом IBMX на деконсервированные клетки.

Литература

1. Kumaresan A. Effect of bovine oviductal fluid on motility, tyrosine phosphorylation, and acrosome reaction in cryopreserved bull spermatozoa // A. Kumaresan, A. Johannisson, P. Humblot, A. S. Bergqvist / Theriogenology. — 2019. — № 124. — P. 48–56. doi: 10.1016/j.theriogenology.2018.09.028.
2. Jankovičová J. Evaluation of protein phosphorylation in bull sperm during their maturation in the epididymis // J. Jankovičová, K. Michalková, P. Sečová, E. Horovská, P. Maňásková-Postlerová, J. Antalíková / Cell Tissue Res. — 2018. — Vol. 371. — № 2. — P. 365–373. doi: 10.1007/s00441-017-2705-x.
3. Seita Y. Generation of live rats produced by in vitro fertilization using cryopreserved spermatozoa // Y. Seita, S. Sugio, J. Ito, N. Kashiwazaki / Biol. Reprod. — 2009. — Vol. 80. — № 3. — P. 503–10. doi: 10.1095/biolreprod.108.072918.
4. Águila L. Sperm capacitation pretreatment positively impacts bovine intracytoplasmic sperm injection // L. Águila, F. Zambrano, M.E. Arias, R. Felmer / Mol. Reprod. Dev. — 2017. — Vol. 84. — № 7. — P. 649–659. doi: 10.1002/mrd.22834.
5. Сметанина И. Г. Использование дибутирил-циклического аденозинмонофосфата для капацитации сперматозоидов при получении эмбрионов крупного рогатого скота in vitro // И. Г. Сметанина, Л. В. Татаринев, А. С. Кривохарченко / Известия РАН. Серия Биологическая. — 2019. — № 4. — P. 353–357.
6. Itzhakov D. Protein kinase A inhibition induces EPAC-dependent acrosomal exocytosis in human sperm // D. Itzhakov, Y. Nitzan, H. Breitbart / Asian. J. Androl. — 2019. — Vol. 21. — № 4. — P. 337–344. doi: 10.4103/aja.aja_99_18.
7. Shah G. V. Is prolactin involved in sperm capacitation? // G. V. Shah, A. R. Sheth / Med. Hypotheses. — 1979. — Vol. 5. — № 8. — P. 909–14. doi: 10.1016/0306-9877(79)90079-3.
8. Pujianto D. A. Prolactin exerts a prosurvival effect on human spermatozoa via mechanisms that involve the stimulation of Akt phosphorylation and suppression of caspase activation and capacitation // D. A. Pujianto, B. J. Curry, R. J. Aitken / Endocrinology. — 2010. — Vol. 151. — № 3. — P. 1269–79. doi: 10.1210/en.2009-0964.
9. Денисенко В. Ю. Роль цитоскелета и протеинкиназ А и С в капацитации и акросомной реакции сперматозоидов быков in vitro / В. Ю. Денисенко, Т. И. Кузьмина, Е. Н. Бойцева // Разведение и генетика животных. — 2015. — № 4. — С. 46–48.
10. Денисенко В. Ю. Освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо сперматозоидов *Bos taurus* в зависимости от их функционального состояния / В. Ю. Денисенко, Т. И. Кузьмина, Е. Н. Бойцева // Цитология. — 2015. — Т. 57. — № 3. — С. 233–239.

11. Pons-Rejraji H. Modulation of bovine sperm signalling pathways: correlation between intracellular parameters and sperm capacitation and acrosome exocytosis // H. Pons-Rejraji, J. L. Bailey, P. Leclerc / Reprod. Fertil. Dev. — 2009. — Vol. 21. — № 4. — P. 511–24. doi: 10.1071/RD07169.
12. Fraser L. R. Sperm capacitation and the acrosome reaction // L. R. Fraser / Hum. Reprod. — 1998. — 13. — P. 9–19. doi: 10.1007/978-3-319-30567-7_5.
13. 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 // E. M. Murphy / Theriogenology. — 2018. — № 108. — P. 217–222. doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.11.034.
14. Salmon V. M. Cholesterol-loaded cyclodextrin increases the cholesterol content of goat sperm to improve cold and osmotic resistance and maintain sperm function after cryopreservation // V. M. Salmon, P. Leclerc, J. L. Bailey / Biol Reprod. — 2016. — Vol. 94. — № 4. — P. 85. doi: 10.1095/biolreprod.115.128553.
15. Fukuda A. Effects of prolactin during preincubation of mouse spermatozoa on fertilizing capacity in vitro // A. Fukuda, C. Mori, H. Hashimoto, Y. Noda, T. Mori, K. Hoshino / J. In Vitro Fert. Embryo. Transf. — 1989. — Vol. 6. — № 2. — P. 92–7. doi: 10.1007/BF01138866.

Chistyakova I., Denisenko V., Kuzmina T.

The effect of IBMX and prolactin on functional status of cryopreserved bull spermatozoa

Abstract.

Purpose: investigate the effect of IBMX (activator of protein phosphorylation) and prolactin (PRL) on the functional state of cryopreserved bovine spermatozoa using inhibitory analysis.

Materials and methods. Frozen-thawed semen samples from 60 black-and-white bulls was used in the experiments. For capacitation, cells were incubated in Sp-TALP medium supplemented with 6 mg/ml bovine serum albumin and various compounds: an inductor of capacitation (IBMX at concentrations of 1 μ M, 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M), hormone (PRL at concentrations of 1 ng, 10 ng, 50 ng, 100 ng) and inhibitors of protein kinases C (Ro 31-8220 at a concentration of 10 ng/ml) and protein kinase A (H-89 at a concentration of 10 μ M). The incubation was carried out at 38°C in an atmosphere of 5% CO₂, 98% humidity for 4 hours. The functional status of the cells was determined by the chlortetracycline test.

Results. It was shown that IBMX at all experimental concentrations did not affect the post-ejaculatory maturation (capacitation and acrosome reaction) of spermatozoa, while all concentrations of PRL (1–100 ng/ml) promoted the acrosome reaction in capacitated cells. In the presence of a protein kinase A inhibitor, there was a decrease in number of capacitated and an increase in number of acrosome-reactive spermatozoa under the action of IBMX at a concentration of 100 μ M and no changes under the action of a protein kinase C inhibitor. Also, in case of protein kinase C inhibition the PRL-related stimulation of the acrosome reaction was canceled, while the usage of H-89 did not affect the functional status of spermatozoa, mediated by PRL. Thus, the influence of IBMX and PRL on the processes of post-ejaculatory maturation in thawed bovine spermatozoa was studied using the inhibitory analysis.

Conclusion. On the capacitation stage all investigated concentrations of IBMX did not affect the ratio of cells with different functional status. PRL promoted the passage of acrosome reaction in capacitated spermatozoa after thawing. Inhibition of protein kinase A during incubation of cells with IBMX mediated processes of acrosome exocytosis in capacitated cells and did not affect this process under PRL action, whereas the inhibitor of protein kinase C allowed to make the ratio of cells with different functional status in direction of increase of capacitated cells, treated by PRL and did not participate in intracellular action, mediated by IBMX in cryopreserved cells.

Key words: capacitation, acrosome reaction, cryoconservation, spermatozoon, bulls.

Authors:

Chistyakova I. — PhD (Biol. Sci.); e-mail: itjereana7@gmail.com;

Denisenko V. — Dr. Habil. (Bio. Sci); e-mail: den.vitaly2016@yandex.ru;

Kuzmina T. — Dr. Habil. (Bio. Sci); e-mail: prof.kouzmina@mail.ru.

Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding — Branch of the L. K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry, 196601, Russia, St. Petersburg, Pushkin, Tyarlevo, Moscovskoe sh. 55a.

References

1. Kumaresan A. Effect of bovine oviductal fluid on motility, tyrosine phosphorylation, and acrosome reaction in cryopreserved bull spermatozoa // A. Kumaresan, A. Johannisson, P. Humblot, A. S. Bergqvist / *Theriogenology*. — 2019. — № 124. — P. 48–56. doi: 10.1016/j.theriogenology.2018.09.028.
2. Jankovičová J. Evaluation of protein phosphorylation in bull sperm during their maturation in the epididymis // J. Jankovičová, K. Michalková, P. Sečová, Ľ. Horovská, P. Maňásková-Postlerová, J. Antalíková / *Cell Tissue Res*. — 2018. — Vol. 371. — № 2. — P. 365–373. doi: 10.1007/s00441-017-2705-x.
3. Seita Y. Generation of live rats produced by in vitro fertilization using cryopreserved spermatozoa // Y. Seita, S. Sugio, J. Ito, N. Kashiwazaki / *Biol. Reprod.* — 2009. — Vol. 80. — № 3. — P. 503–10. doi: 10.1095/biolreprod.108.072918.
4. Águila L. Sperm capacitation pretreatment positively impacts bovine intracytoplasmic sperm injection // L. Águila, F. Zambrano, M.E. Arias, R. Felmer / *Mol. Reprod. Dev.* — 2017. — Vol. 84. — № 7. — P. 649–659. doi: 10.1002/mrd.22834.
5. Smetanin I. G. The use of dibutiril-cyclic adenosine monophosphate for cummattozoa cans when producing cattle embryos in vitro // I. G. Smetanin, L. V. Tatarinov, A. S. Krivakharchenko / *Izvestia RAS. Biological series*. — 2019. — № 4. — P. 353–357.
6. Itzhakov D. Protein kinase A inhibition induces EPAC-dependent acrosomal exocytosis in human sperm // D. Itzhakov, Y. Nitzan, H. Breitbart / *Asian. J. Androl.* — 2019. — Vol. 21. — № 4. — P. 337–344. doi: 10.4103/aja.aja_99_18.
7. Shah G. V. Is prolactin involved in sperm capacitation? // G. V. Shah, A. R. Sheth / *Med. Hypotheses*. — 1979. — Vol. 5. — № 8. — P. 909–14. doi: 10.1016/0306-9877(79)90079-3.
8. Pujianto D. A. Prolactin exerts a prosurvival effect on human spermatozoa via mechanisms that involve the stimulation of Akt phosphorylation and suppression of caspase activation and capacitation / D. A. Pujianto, B. J. Curry, R. J. Aitken // *Endocrinology*. — 2010. — Vol. 151. — № 3. — P. 1269–79. doi: 10.1210/en.2009-0964.
9. Denisenko V. Yu. The role of the cytoskeleton and protein kinases A and C in the Capacital and acrosomous reaction of spermatozoa bulls in vitro / V. Yu Denisenko, T. I. Kuzmina, E. N. Boytseva // *Breeding and genetics of animals*. — 2015. — № 4. — P. 46–48.
10. Denisenko V. Yu. Obsobhemium CA2 + from intracellular depot of spermatozoa Bos Taurus, depending on their functional state / V. Yu. Denisenko, T. I. Kuzmina, E. N. Boytseva // *Cytology*. — 2015. — Vol. 57. — № 3. — P. 233–239.
11. Pons-Rejraji H. Modulation of bovine sperm signalling pathways: correlation between intracellular parameters and sperm capacitation and acrosome exocytosis // H. Pons-Rejraji, J. L. Bailey, P. Leclerc / *Reprod. Fertil. Dev.* — 2009. — Vol. 21. — № 4. — P. 511–24. doi: 10.1071/RD07169.
12. Fraser L. R. Sperm capacitation and the acrosome reaction // L. R. Fraser / *Hum. Reprod.* — 1998. — № 13. — P. 9–19. doi: 10.1007/978-3-319-30567-7_5.
13. Murphy E. M. Effect of increasing equilibration time of diluted bull semen up to 72 h prior to freezing on spermquality parameters and calving rate following artificial insemination // E. M. Murphy / *Theriogenology*. — 2018. — № 108. — P. 217–222. doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.11.034.
14. Salmon V. M. Cholesterol-loaded cyclodextrin increases the cholesterol content of goat sperm to improve cold and osmotic resistance and maintain sperm function after cryopreservation // V. M. Salmon, P. Leclerc, J. L. Bailey / *Biol Reprod.* — 2016. — Vol. 94. — № 4. — P. 85. doi: 10.1095/biolreprod.115.128553.
15. Fukuda A. Effects of prolactin during preincubation of mouse spermatozoa on fertilizing capacity in vitro // A. Fukuda, C. Mori, H. Hashimoto, Y. Noda, T. Mori, K. Hoshino / *J. In Vitro Fert. Embryo. Transf.* — 1989. — Vol. 6. — № 2. — P. 92–7. doi: 10.1007/BF01138866.