

Strontium Supports Capacitation and the Acrosome Reaction in Mouse Sperm and Rapidly Activates Mouse Eggs

Lynn R. Fraser

Department of Anatomy and Human Biology, King's College London (KQC), Strand, London, England

Gamete Research 18:363–374 (1987)

Prezentacja: Katarzyna Świtoń

Wstęp

- Plemniki ssaków, żeby uzyskać zdolność do zapłodnienia, muszą przejść proces kapacytacji, na który składa się m.in. zajście reakcji akrosomowej oraz wytworzenie się wzmożonej aktywności plemników, a także przebudowa białek w ich błonie plazmatycznej.
- Kapacytacja zachodzi u myszy w drogach rodnych samicy, gdzie plemniki muszą przebywać około 2-3 godzin, żeby uzyskać zdolność do zapłodnienia.
- Przypuszczalnie wpływ mają zmiany pH i stężenia wolnych jonów Ca^{2+} w plemniku, ale nie jest tak u wszystkich gatunków – plemniki świnki morskiej nie muszą przechodzić kapacytacji w środowisku zawierającym jony Ca^{2+} , żeby były zdolne do zapłodnienia.
- Jony Ca^{2+} są też wymagane przez komórki jajowe – oscylacyjne zmiany stężenia jonów Ca^{2+} po zapłodnieniu prowadzą do wytworzenia bloku przeciwko polispermii poprzez wyrzut ziaren korowych.

Cel doświadczenia

Czy inne dwudodatnie jony są w stanie zastąpić jony Ca^{2+} podczas procesów kapacytacji i zapłodnienia u myszy?

Materiały i metody

- Zawiesina plemników myszy o stężeniu ok. $1-2 \times 10^6$ plemników/ml i oocyty myszy pobierane z jajowodów samic stymulowanych hormonalnie PMSG i hCG (14h po hCG); część oocytów pozbawiona osłonki przejrzystej przez inkubację w hialuronidazie,
- Podstawowa pożywka – zmodyfikowana pożywka Tyrode'a bez pirogronianu i mleczanu, wzbogacona o glukozę i 1.8mM CaCl_2
- 3 pożywki zamiast CaCl_2 zawierające odpowiednio 1.8mM SrCl_2 , MgCl_2 lub BaCl_2
- Pożywka bez CaCl_2
- Wszystkie inkubacje prowadzone w 37°C , na szalkach zalanych płynną parafiną

Metody c.d.

- Kapacytacja i zapłodnienie

- Oocyty z osłonką przejrzystą

Zawiesiny plemników preinkubowano w pożywkach zawierających Ca^{2+} , Sr^{2+} lub bez Ca^{2+} . Oocyty dodawano po 30 lub 120 minutach od dodania plemników. Zawiesiny rozcieńczano w roztworze zawierającym Ca^{2+} , jedna zawiesina Sr^{2+} rozcieńczona w pożywce z Sr^{2+} . Utrwalenie oocytów i ocenę zapłodnienia/aktywacji przeprowadzano po 75 minutach od dodania ich do zawiesiny plemników.

- Oocyty bez osłonki przejrzystej

Zawiesinę plemników preinkubowano w pożywce z Sr^{2+} . Oocyty dodawano po 120 minutach od dodania plemników. Zawiesinę rozcieńczono w pożywce z Sr^{2+} .

Metody c.d.

- Reakcja akrosomowa

Zawiesiny plemników przygotowano w pożywkach z Ca^{2+} , Sr^{2+} , Mg^{2+} lub Ba^{2+} i inkubowano przez 120 minut. Następnie zawiesinę filtrowano żeby wybrać ruchliwe plemniki, utrwalano ją w formalinie i przygotowano slajdy, na których oceniano plemniki pod kątem obecności akrosomu (przynajmniej 100 plemników z każdej grupy).

- Aktywacja oocytów

Dodano oocyty do zawiesiny plemników inkubowanych przez 120 minut w Sr^{2+} . Około połowę oocytów zabrano po 15 minutach i przeniesiono do pożywki z Ca^{2+} , gdzie usunięto kom. folikularne i plemniki. W tym samym czasie inkubowano same oocyty w pożywce Sr^{2+} . Po 75 minutach utrwalono wszystkie 3 partie oocytów i oceniono pod kątem zapłodnienia lub aktywacji.

- Wyrzut ziaren korowych

Wyniki

- Kapacytacja i zapłodnienie

TABLE 1. Fertilizing Ability of Mouse Sperm Preincubated in Ca^{2+} -Deficient, Ca^{2+} -Containing, or Sr^{2+} -Containing Medium and Assessed in the Presence of Ca^{2+} or Sr^{2+}

Length of pre-incubation (min)	Medium		Eggs		
	Preincubation	Fertilization	Total No.	Fertilized ^a	Activated ^a
30	Ca^{2+}	Ca^{2+}	109	60.3 ± 27.5	0
	Sr^{2+}	Sr^{2+}	92	2.0 ± 1.4	57.3 ± 17.8
	Sr^{2+}	Ca^{2+}	112	70.7 ± 20.3	0
	0	Ca^{2+}	62	2.0 ± 2.8	0
120	Ca^{2+}	Ca^{2+}	99	96.3 ± 2.9	0
	Sr^{2+}	Sr^{2+}	73	12.3 ± 0.3	55.3 ± 18.1
	Sr^{2+}	Ca^{2+}	74	91.0 ± 6.7	0
	0	Ca^{2+}	60	16.6 ± 14.0	0
Zona-free eggs	Sr^{2+}	Sr^{2+}	37	97.0 ± 4.2	0

^aMean % ± SEM.

- W próbie po 30min inkubacji mniej niż połowa oocytów doszła do telofazy II z w pełni zdekondensowaną główką plemnika <wniknięcie plemnika nie zaszło od razu – niepełna kapacytacja>. Z kolei większość aktywowanych oocytów osiągnęła telofazę II. Po 120min dekonkondensacja zaszła w 98-100% zapłodnionych oocytów.

Wyniki c.d.

- Reakcja akrosomowa

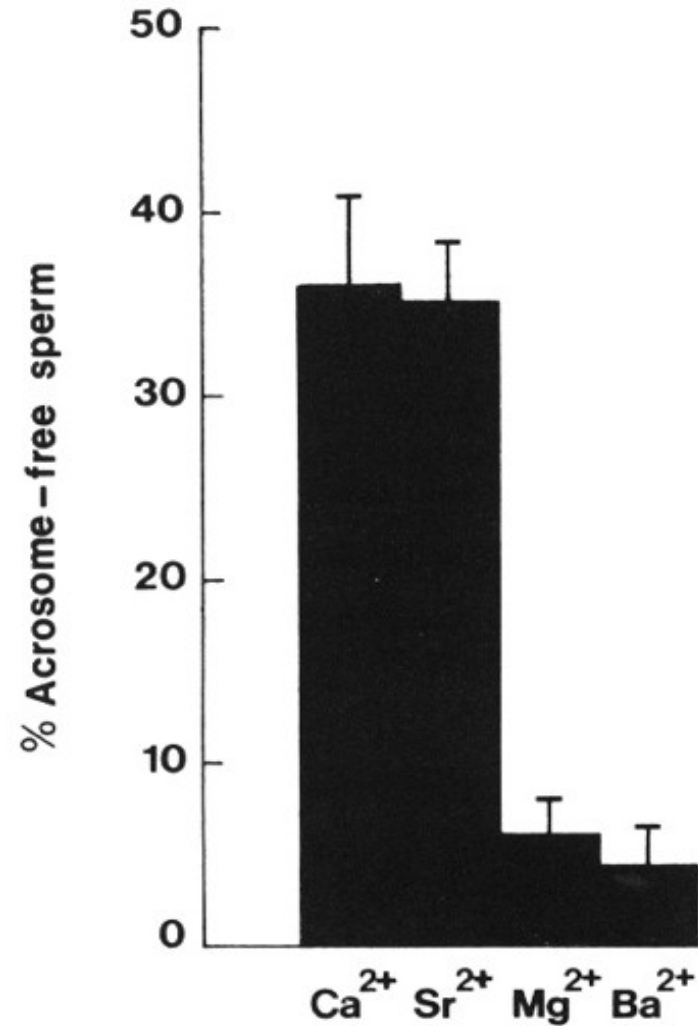


Fig. 1. Acrosome loss in mouse sperm suspensions incubated for 120 min in media containing 1.8 mM Ca²⁺, Sr²⁺, Mg²⁺, or Ba²⁺. Data are presented as mean % ± SEM.

Wyniki c.d.

- Aktywacja oocytów

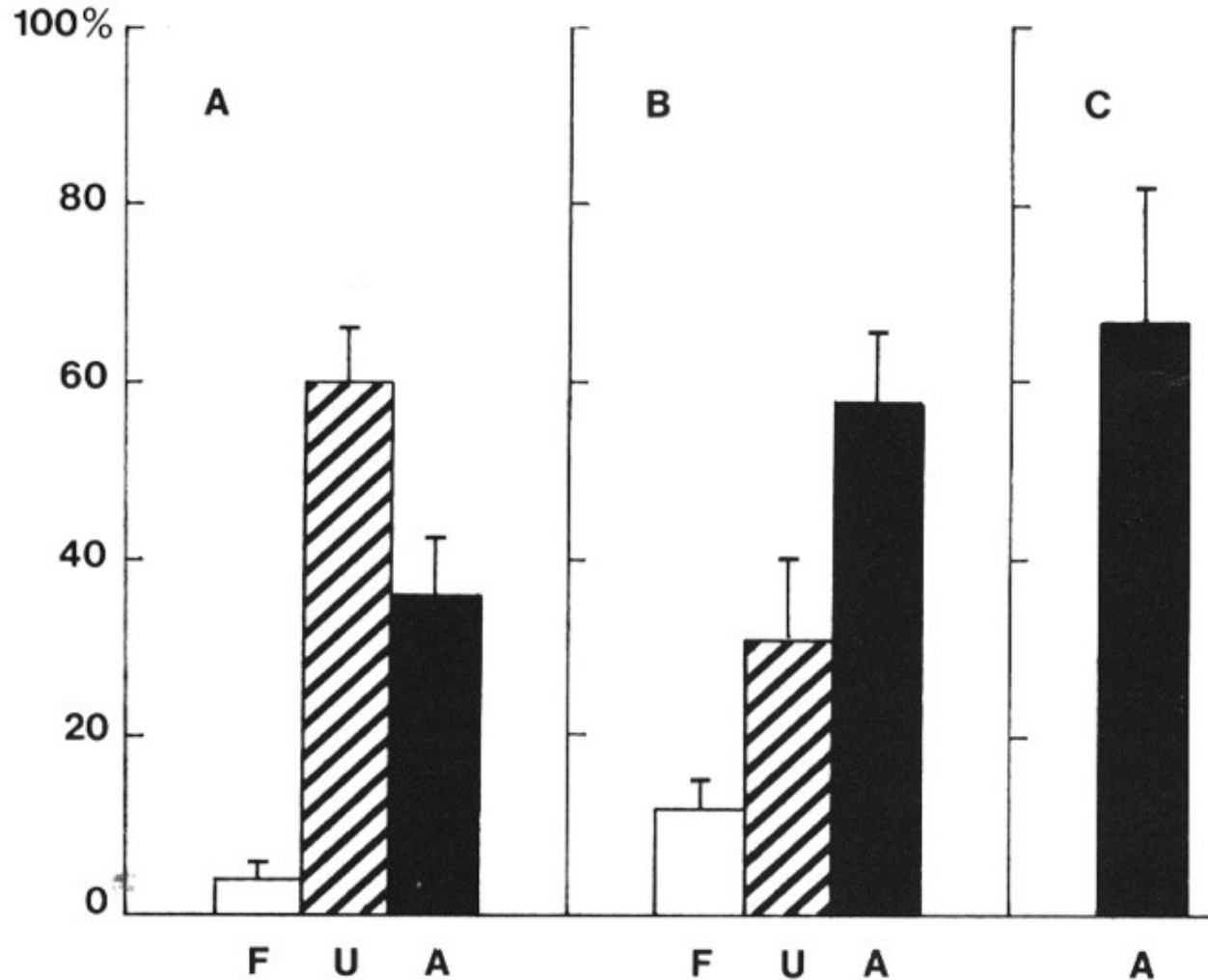


Fig. 2. The proportion of eggs that were fertilized (F), unfertilized (U), or activated (A) after the following treatments: **A**: incubation for 15 min in Sr^{2+} sperm suspensions followed by cumulus cell removal and incubation for 60 min in Ca^{2+} medium; **B**: incubation for 75 min in Sr^{2+} sperm suspension; **C**: incubation for 75 min in sperm-free Sr^{2+} medium.

♦ Aktywacja oocytów c.d.

Prawie wszystkie oocyty inkubowane w Sr^{2+} , aktywowane i nieaktywowane, miały liczne plemniki pływające w przestrzeni okołozółtkowej – wniknęły tam przed momentem aktywacji oocytu.

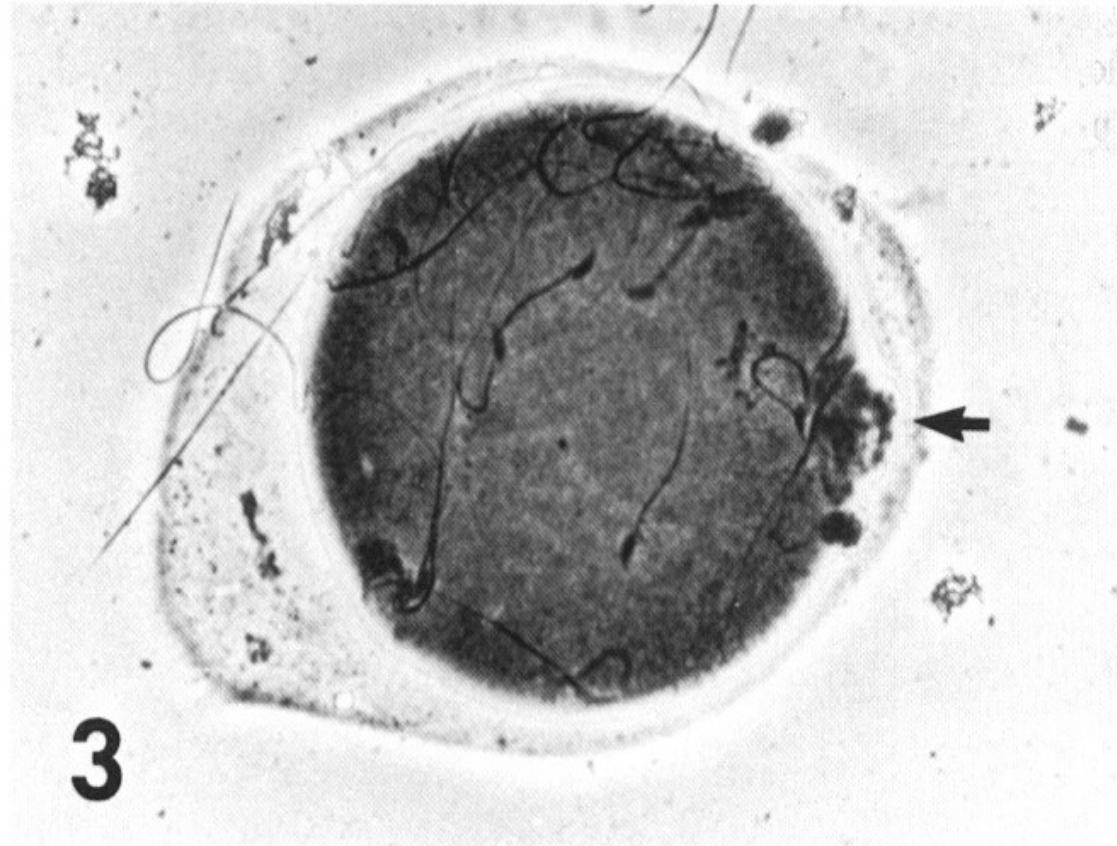


Fig. 3. Sr^{2+} -activated egg with numerous sperm inside the zona pellucida; no sperm have been incorporated into the egg cytoplasm. The second polar body is indicated by an arrow. $\times 500$.

Wyniki c.d.

- Wyrzut ziaren korowych

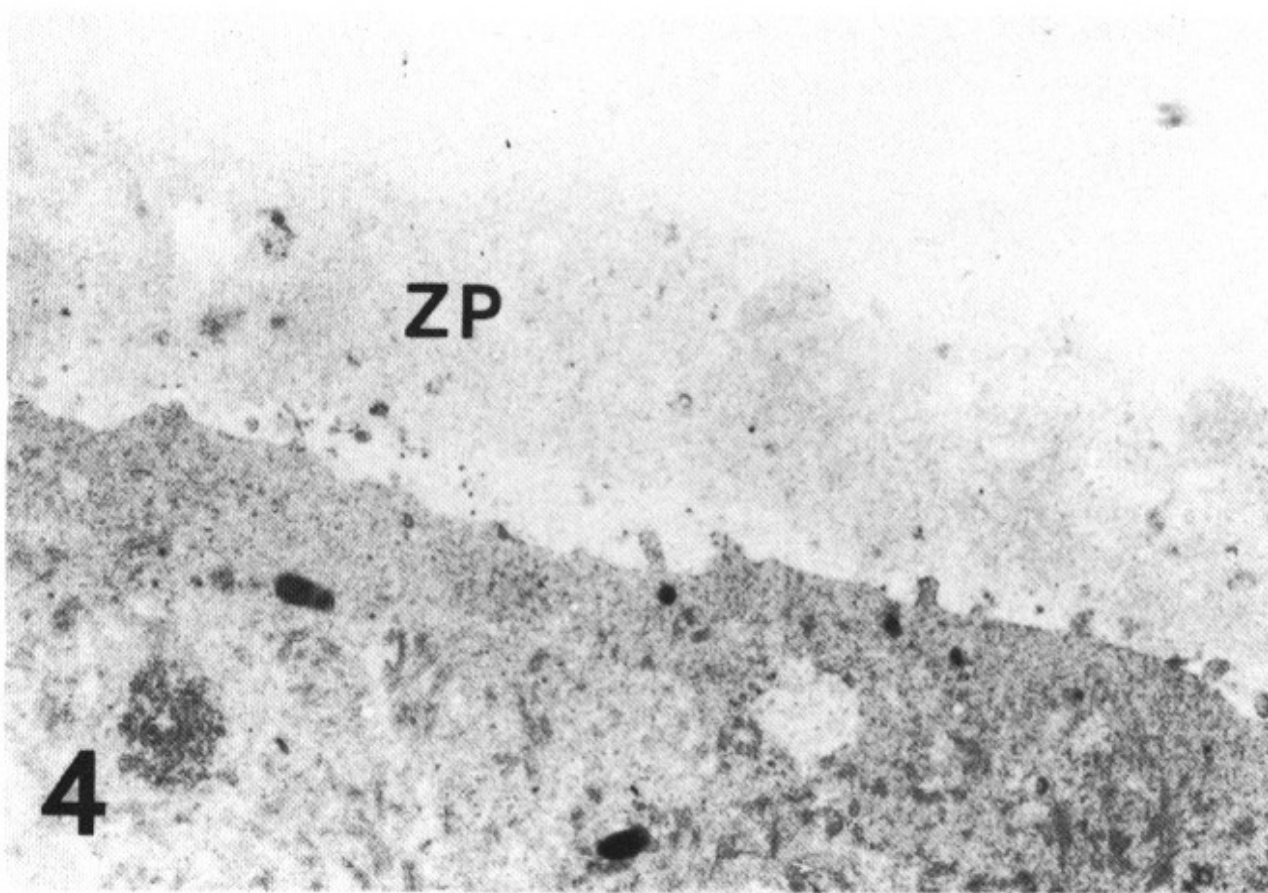


Fig. 4. Cortical region of a mouse egg incubated for 35 min in Sr^{2+} medium; most cortical granules have disappeared. ZP, zona pellucida. $\times 5,000$.

Wnioski

- Jony strontu są w stanie zastąpić jony wapnia we wszystkich procesach, którym podlegają mysie plemniki, od kapacytacji do fuzji z oocytem (choć w tym ostatnim przypadku trzeba było użyć oocytów bez osłonki przejrzystej). Nie widać przy tym znaczących różnic w przebiegu tych procesów, bez względu na to, czy w środowisku były obecne jony strontu, czy wapnia.
- Jony strontu wywołują szybką aktywację oocytów, nawet tych świeżo owulowanych, niepodatnych na aktywację innymi sposobami. Możliwe przyczyny – pobudzanie przez Sr^{2+} receptorów rozkładających PIP2 do IP3 i DAG. Wypieranie jonów Ca^{2+} przez Sr^{2+} ?
- Krótkie (15min) wystawienie oocytów na działanie jonów strontu jest wystarczające do wyrzutu ziaren korowych, chociaż dłuższy czas był potrzebny do pełnej aktywacji oocytów i wznowienia mejozy.
- Jony Mg^{2+} i Ba^{2+} nie są w stanie zastąpić w pełni jonów wapnia.

Dziękuję za uwagę