

УЧАСТИЕ КЛЕТОК ГРАНУЛЕЗЫ В ОПОСРЕДОВАНИИ ДЕЙСТВИЯ ПРОЛАКТИНА И СОМАТОТРОПИНА НА ООЦИТ-КУМУЛЮСНЫЕ КОМПЛЕКСЫ КОРОВ *IN VITRO*

© *И. Ю. Лебедева, Т. В. Кибардина, Т. И. Кузьмина*

*Всероссийский научно-исследовательский институт генетики
и разведения сельскохозяйственных животных РАСХН, Санкт-Петербург—Пушкин;
электронный адрес: irladv@mail.ru*

Изучали созревание ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК) коров в средах, полученных после культивирования клеток гранулы с пролактином (ПРЛ, 50 нг/мл) и соматотропным гормоном (СТГ, 10 нг/мл). Среда, кондиционированная гранулезными клетками в присутствии ПРЛ или СТГ, оказывала стимулирующее влияние на пролиферативную активность клеток кумулюса. Внесение СТГ в культуру клеток гранулы обуславливало также снижение доли кумулюсных клеток с дегенерированным хроматином при последующем культивировании ОКК. В то же время экспансия кумулюса не зависела от наличия гормонов в среде культивирования клеток гранулы. При созревании ОКК в кондиционированных средах было выявлено кратковременное торможение реинициации мейоза ооцитов (через 6 ч культивирования) в обеих опытных группах по сравнению с контролем. Кроме того, добавление СТГ или ПРЛ в культуру гранулезных клеток приводило к последующему снижению доли ооцитов с признаками дегенерации хромосом, которое наблюдалось уже к 6 ч инкубации и сохранялось в течение периода культивирования ОКК. При этом более раннее возобновление мейоза было сопряжено с более высокой частотой дегенерации ядерного материала в ооцитах. Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что клетки гранулы опосредуют, по крайней мере частично, влияние СТГ и ПРЛ на созревание ОКК коров *in vitro*, причем для проведения гормонального сигнала не требуется контакта между ОКК и гранулезными клетками.

Ключевые слова: пролактин, соматотропный гормон, клетки гранулы, ооциты, клетки кумулюса, созревание *in vitro*, мейоз.

Принятые сокращения: ИФР I — инсулиноподобный фактор роста I, ОКК — ооцит-кумулюсные комплексы, ПРЛ — пролактин, СТГ — соматотропный гормон.

Созревание фолликулов и ооцитов в яичниках млекопитающих находится под контролем многочисленных факторов, поступающих из кровеносной системы или синтезируемых локально. Как известно, гонадотропные гормоны (фолликулостимулирующий и лютеинизирующий) являются главными регуляторами овариальной функции. В последние годы было показано, что два других гормона гипофиза — пролактин (ПРЛ) и соматотропный гормон (СТГ) — также участвуют в регуляции роста и развития овариальных фолликулов (Dusza, Tilton, 1990; Bole-Feysot et al., 1998; Bartke, 1999; Hull, Harvey, 2001). Кроме того, ряд имеющихся данных свидетельствует о влиянии этих гормонов на оогенез у различных видов млекопитающих. В частности, было установлено, что у мышей с инактивированным геном для лактогенного или соматотропного рецептора нарушается или ослабляется репродуктивная функция, в том числе нормальный процесс созревания ооцитов (Bole-Feysot et al., 1998; Bartke, 1999). У женщин с пониженным содержанием ПРЛ и СТГ в крови и фолликулярной жидкости наблюдалось снижение оплодотворяемости и качества ооцитов, а также жизнеспособности полученных *in vitro* эмбрионов (Mendoza et al., 1999; Doldi et al., 2000; Mendes et

al., 2001). При суперовуляции половозрелых телок более высокая концентрация ПРЛ была выявлена в жидкости фолликулов, содержащих более зрелые и жизнеспособные ооциты (Wise et al., 1994). Обработка овец СТГ во время суперовуляции приводила к повышению оплодотворяемости яйцеклеток *in vivo* и последующего качества эмбрионов (Folch et al., 2001). При этом у различных видов млекопитающих в ооцитах и окружающих их кумулюсных клетках обнаружено наличие соматотропных и лактогенных рецепторов или их мРНК (Hull, Harvey, 2001; Marchal et al., 2003; Picazo et al., 2004).

С использованием модели культивирования *in vitro* окруженных кумулюсом ооцитов у некоторых видов млекопитающих были получены данные, в целом согласующиеся с гипотезой об участии СТГ и ПРЛ в регуляции формирования зрелых яйцеклеток (Yoshimura et al., 1991; Marchal et al., 2003). При этом наибольшее внимание исследователей было направлено на изучение влияния СТГ и ПРЛ на ооцит-кумулюсные комплексы (ОКК) у крупного рогатого скота. Было показано, что реализация различных эффектов СТГ и ПРЛ на ооциты коров зависит от используемой гормональной концентрации и состава системы культивирования (Izadyar et al., 1996;

Kuzmina et al., 1999; Кузьмина и др., 2001; Dong et al., 2001). При определенных условиях СТГ и ПРЛ оказывали стимулирующее влияние на созревание и жизнеспособность ооцитов, а также их оплодотворяемость и потенцию к дальнейшему развитию. Ряд авторов выявили также позитивное влияние СТГ и ПРЛ на морфофункциональное состояние клеток кумулюса, окружающих ооциты (Кузьмина и др., 1999; Kölle et al., 2003). Кроме того, было обнаружено, что стимулирующее влияние СТГ на ядерное созревание ооцитов опосредуется кумулюсными клетками, несмотря на присутствие соматотропных рецепторов и их мРНК в ооцитах коров (Izadyar et al., 1997; Kölle et al., 1998).

Ранее нами было показано, что внесение клеток гранулы коров, обладающих лактогенными и соматотропными рецепторами (Лебедева и др., 2001), в среду культивирования ОКК коров приводит к модификации влияния ПРЛ и СТГ на ядерное созревание ооцитов и их способность к дальнейшему развитию (Kuzmina et al., 1998; Кузьмина и др., 2001). Это свидетельствовало о том, что гранулезные клетки могут участвовать в опосредовании действия ПРЛ и СТГ на ОКК. Поэтому в представленной работе нами исследовано *in vitro* созревание ОКК коров в средах, полученных после культивирования клеток гранулы с бычьим ПРЛ (50 нг/мл) и рекомбинантным бычьим СТГ (10 нг/мл). Гормоны были использованы в концентрациях, в которых они оказывали максимальный митогенный эффект в культуре клеток гранулы коров (Лебедева и др., 1995, 2000).

Материал и методика

Объектом исследования служили ОКК и клетки гранулы из антральных фолликулов яичников коров и половозрелых телок. Использовали полученные на мясокombинате яичники без видимых признаков патологии, находящиеся на стадии фолликулярного роста и рассасывающегося желтого тела. Яичники доставляли в лабораторию при температуре 30—35 °С в течение 2 ч после овариэктомии животных и многократно отмывали в стерильном физиологическом растворе с антибиотиками (100 ед./мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина).

Клетки гранулы получали путем аспирации жидкости из фолликулов диаметром 3—5 мм с помощью туберкулиновой иглы и последующего центрифугирования материала при 250 g в течение 10 мин. После удаления супернатанта клетки дважды отмывали путем ресуспендирования в среде ТС-199, содержащей 2 % фетальной бычьей сыворотки. Конечную концентрацию клеток подсчитывали в гемоцитометре, долю живых клеток определяли с помощью 0.1 %-ного трипанового синего. Для культивирования использовали суспензию клеток гранулы в концентрации $2.0 \cdot 10^6$ — $2.5 \cdot 10^6$ в 1 мл среды, при этом доля живых клеток была не менее 60 %.

В экспериментах использовали препараты гипофизарного бычьего ПРЛ (Институт эндокринологии РАМН, Москва) и рекомбинантного бычьего СТГ (Monsanto, США), а также среду ТС-199 (с L-глутамином), воду для культивирования клеток, минеральное масло (Sigma, США), гентамицин, лактат кальция, пируват натрия (ICN, США), трипановый синий (Serva, Германия) и фетальную бычью сыворотку («Биолот», Россия).

Для получения монослойной культуры клетки предварительно культивировали в среде ТС-199, содержащей 10 % сыворотки и 50 мкг/мл гентамицина, в течение 1 сут во флаконах (Flow) при 38.5 °С в атмосфере с 5 % CO₂. За образованием монослойной культуры следили с помощью инвертированного микроскопа БИОЛАМ П-1. Через 24 ч проводили смену среды, в опытные группы вносили ПРЛ (50 нг/мл) или СТГ (10 нг/мл). Культивирование клеток продолжали в течение 48 ч, затем кондиционированную среду отделяли от клеток путем центрифугирования при 300 g в течение 20 мин. В отобранные образцы сред добавляли лактат кальция и пируват натрия до концентраций соответственно 0.55 и 0.23 мг/мл. Среда фильтровалась через стерильный фильтр с диаметром пор 22 мкм, замораживали и хранили при –20 °С не более 3 мес. После удаления среды клетки фиксировали смесью метанола и уксусной кислоты (3 : 1) и окрашивали азуром—эозином. Плотность клеток гранулы в культурах, оцененная по среднему числу клеток на условную единицу площади флакона, не различалась между контрольной и опытными группами. Эксперименты по культивированию клеток гранулы были проведены 4 раза.

Ооцит-кумулюсные комплексы (ОКК) выделяли путем рассечения стенки фолликулов диаметром 2—6 мм и промывали 3 раза в среде ТС-199, содержащей 10 % фетальной бычьей сыворотки и 50 мкг/мл гентамицина. Для экспериментов отбирали ооциты округлой формы, с гомогенной цитоплазмой, равномерной по ширине зоной пеллюцида, окруженные многослойным компактным кумулюсом. Культивирование ОКК проводили в 6-луночных планшетах группами по 15—20 шт. в каплях кондиционированной среды объемом 200 мкл, покрытых минеральным маслом, при 38.5 °С в атмосфере с 5 % CO₂ и 90 %-ной влажностью. Время инкубации составляло 6, 12, 18 и 24 ч. В конце 24-часового периода культивирования ОКК классифицировали морфологически по трем категориям в зависимости от степени экспансии кумулюса — высокой, средней или низкой (Armstrong et al., 1996). Все манипуляции с ОКК, а также их морфологическую оценку проводили под стереомикроскопом МБС-9.

После культивирования в течение 24 ч часть ОКК использовали для определения доли клеток кумулюса с признаками дегенерации хромосомного материала, а также находящихся на стадии профазы. Для этого клетки фиксировали смесью метанола и уксусной кислоты (3 : 1) и окрашивали азуром—эозином. Использовали морфологические критерии дегенерации хроматина, описанные нами ранее (Лебедева и др., 2004). Для цитогенетического исследования ядерного материала ооцитов готовили препараты хромосом по методу Тарковского (Tarkowski, 1966). С этой целью ооциты помещали на 5—10 мин в раствор цитрата натрия (0.9 %) и с помощью препаровальной иглы механически очищали от кумулюса. Затем клетки переносили на сухое обезжиренное стекло, фиксировали смесью метанола и уксусной кислоты (3 : 1) и окрашивали по Романовскому—Гимза. Исследование ядерного материала в ооцитах и кумулюсных клетках проводили с помощью микроскопа Olympus (Япония). Состояние хроматина в ооцитах оценивали в соответствии с критериями, описанными ранее (Эрнст и др., 1979, 1980).

Эксперименты по культивированию ОКК были выполнены 5 раз (6 ч), 4 раза (12 и 18 ч) или 6 раз (24 ч).

Статистический анализ проводили на компьютере по программе SigmaStat. Данные обрабатывали методом двухфакторного дисперсионного анализа, достоверность различия сравниваемых средних значений оценивали с использованием критерия Тьюки (Лакин, 1990), при этом был принят уровень значимости $P < 0.05$. При сравнении распределения нормальных и дегенерированных ооцитов по стадиям мейоза через 6 ч культивирования использовали критерий χ^2 .

Результаты

Для оценки созревания ОКК коров *in vitro* в средах, полученных после культивирования клеток гранулы, нами был проведен анализ состояния хроматина в соматических и половых клетках комплексов, а также морфологии кумулюса.

Клетки кумулюса исследовали через 24 ч культивирования ОКК. Пролиферативная активность кумулюсных клеток была оценена на основании доли клеток, находящихся на стадии профазы. При созревании ОКК в средах, полученных после культивирования клеток гранулы в присутствии СТГ и ПРЛ, было обнаружено повышение доли клеток кумулюса на стадии профазы по сравнению с контролем (рис. 1, а). При этом воздействие ПРЛ на гранулезные клетки обуславливало более высокую пролиферативную активность клеток кумулюса, чем воздействие СТГ ($P < 0.05$). Внесение СТГ в культуру клеток гранулы приводило также к снижению доли кумулюсных клеток с дегенерированным хроматином при последующем культивировании ОКК (рис. 1, б). В то же время наличие исследуемых гормонов в среде культивирования гранулезных клеток не влияло на степень экспансии кумулюса, сопутствующей созреванию ооцитов (см. таблицу).

Динамика ядерного созревания ооцитов коров была различной в средах, полученных после культивирования клеток гранулы в присутствии и в отсутствие гормонов. Обработка гранулезных клеток СТГ и ПРЛ приводила к повышению доли ооцитов, находящихся на стадии диплотены, через 6 ч инкубации ОКК в кондиционированных средах (рис. 2, а). Это тормозящее влияние сред, кондиционированных клетками гранулы в присутствии гормонов, на реинициацию мейоза ооцитов было кратковременным и не наблюдалось через 12 ч культивирования. Также не было обнаружено достоверных различий в доле ооцитов, достигших стадий телофазы I и метафазы II, между контрольной и опытными группами через 18 и 24 ч созревания ОКК (рис. 2, б).

Внесение СТГ и ПРЛ в культуру клеток гранулы обуславливало достоверное снижение по сравнению с контролем доли ооцитов с признаками дегенерации хромосом во время последующего культивирования ОКК в кондиционированных средах (рис. 3). Положительный эффект этих сред на состояние ядерного материала в ооцитах наблюдался уже к 6 ч инкубации и сохранялся в течение всего периода культивирования. Поскольку тормозящее влияние сред, кондиционированных клетками гранулы в присутствии СТГ и ПРЛ, на ядерное созревание ооцитов было выявлено также на 6 ч культивирования ОКК, был проведен анализ распределения нормальных и дегенерированных ооцитов по стадиям мейоза в этот период созревания. Оказалось, что в целом 84.6 % ооцитов с признаками дегенерации хромо-

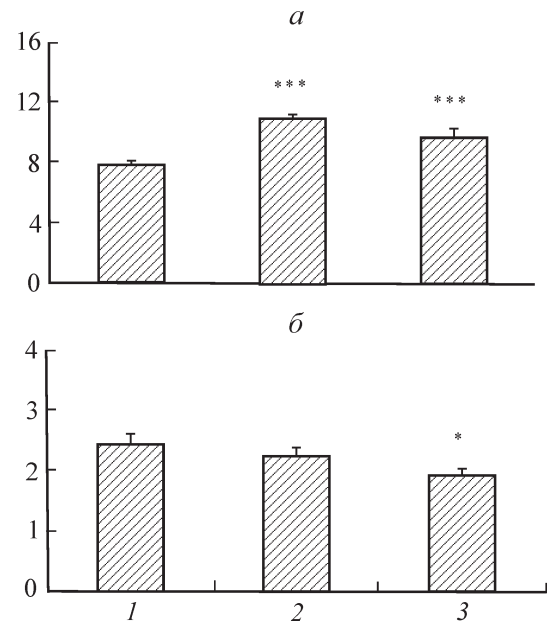


Рис. 1. Пролиферативная активность (а) и уровень дегенерации (б) клеток кумулюса при культивировании ОКК коров в средах, кондиционированных клетками гранулы коров.

По вертикали — доля клеток (%), находящихся на стадии профазы, от общего числа клеток с нормальным хроматином (а) или клеток с признаками дегенерации хроматина (б), %. Числа под столбиками — системы культивирования: контроль (1), 50 нг/мл ПРЛ (2), 10 нг/мл СТГ (3). Каждый столбик — среднее для 26 ОКК. Вертикальные отрезки — стандартные ошибки средних значений. Звездочки показывают достоверные различия по сравнению с контролем: одна — $P < 0.05$, три — $P < 0.001$. Время культивирования ОКК 24 ч.

Fig. 1. Proliferative activity (a) and the level of degeneration (b) of cumulus cells, at bovine oocyte-cumulus complexes (OCC) at culturing in media conditioned by bovine granulosa cells.

In the vertical — the share of cells being at prophase stage out of the total number of cells with normal chromatin (a), or that of cells with signs of chromatin degeneration (b), %. Digits under bars — culture systems: control (1), 50 ng/ml PRL (2), 10 ng/ml ST (3). Each bar — the mean for 26 OCC. Vertical segments — standard errors of means. Asterisks — significant differences, as compared to the control: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. Time of OCC culture 24 h.

сом находятся на продвинутых стадиях мейоза (от диакинеза до метафазы I), тогда как только 19.2 % ооцитов без хромосомных нарушений реиницировали мейоз ($P < 0.001$). При этом в контрольной группе все дегенерированные ооциты находились на стадии диакинеза или метафазы I.

Морфологическая характеристика ОКК коров по степени экспансии кумулюса после культивирования в средах, кондиционированных клетками гранулы коров (время культивирования 24 ч)

Система культивирования	Доля ОКК с различной степенью экспансии кумулюса, % ^а		
	высокой	средней	низкой
Контроль	43.3 ± 1.9	52.3 ± 3.4	4.5 ± 2.1
ПРЛ, 50 нг/мл	48.5 ± 2.1	48.7 ± 2.0	2.8 ± 1.3
СТГ, 10 нг/мл	47.8 ± 1.7	49.3 ± 2.5	2.9 ± 1.4

^а Указаны средние значения ± стандартные ошибки в 6 экспериментах.

Рис. 2. Реинициация мейоза (а) и ядерное созревание ооцитов (б) при культивировании ОКК коров в средах, кондиционированных клетками гранулы коров.

По вертикали — доля ооцитов (%), находящихся на стадии диплотены (а) или достигших стадий телофазы I или метафазы II (б). Числа под столбиками — время культивирования, ч. Каждый столбик — среднее для 5 (6 ч), 4 (12 и 18 ч) или 6 экспериментов (24 ч). Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

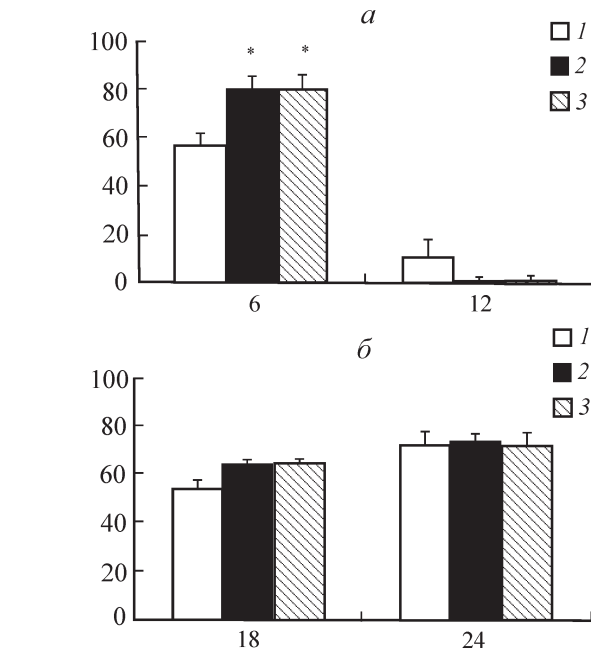
Fig. 2. Meiosis resumption (a) and nuclear maturation of oocytes (b) at bovine OCC culturing in media conditioned by bovine granulosa cells.

In the vertical: the share of oocytes being at diplotene stage (a), or that of oocytes being at telophase I and metaphase II stages (b), %. Digits under bars — culture duration, h. Each bar — the mean for 5 (6 h), 4 (12 and 18 h) or 6 experiments (24 h). Other designations are the same as in Fig. 1.

Обсуждение

Результаты настоящего исследования показывают, что воздействие бычьих СТГ и ПРЛ на клетки гранулы коров влияет на созревание ОКК коров в средах, кондиционированных этими клетками. Внесение обоих гормонов в культуру гранулезных клеток приводило к торможению реинициации мейоза ооцитов, снижению частоты дегенерации хромосом в ооцитах и повышению пролиферативной активности клеток кумулюса. Кроме того, в среде, кондиционированной клетками гранулы в присутствии СТГ, наблюдали ингибирование деструкции хроматина в кумулюсных клетках.

Полученные данные свидетельствуют о том, что клетки гранулы в отсутствие контакта с ОКК коров опосредовали влияние СТГ и ПРЛ на созревание этих комплексов *in vitro*. Ранее нами не было выявлено ника-



кого эффекта СТГ и ПРЛ на стероидогенную активность гранулезных клеток в монослойной культуре (Lebedeva et al., 2003). Это указывает на то, что в ответ на действие СТГ и ПРЛ клетки гранулы коров продуцируют растворимые паракринные факторы, которые в свою очередь оказывают регуляторное влияние на состояние хроматина и функциональную активность соматических и половых клеток ОКК. Как известно, ПРЛ и СТГ регулируют экспрессию различных генов в клетках-мишенях, в том числе в яичнике (Doppler, 1994; Postel-Vinay, Finido-

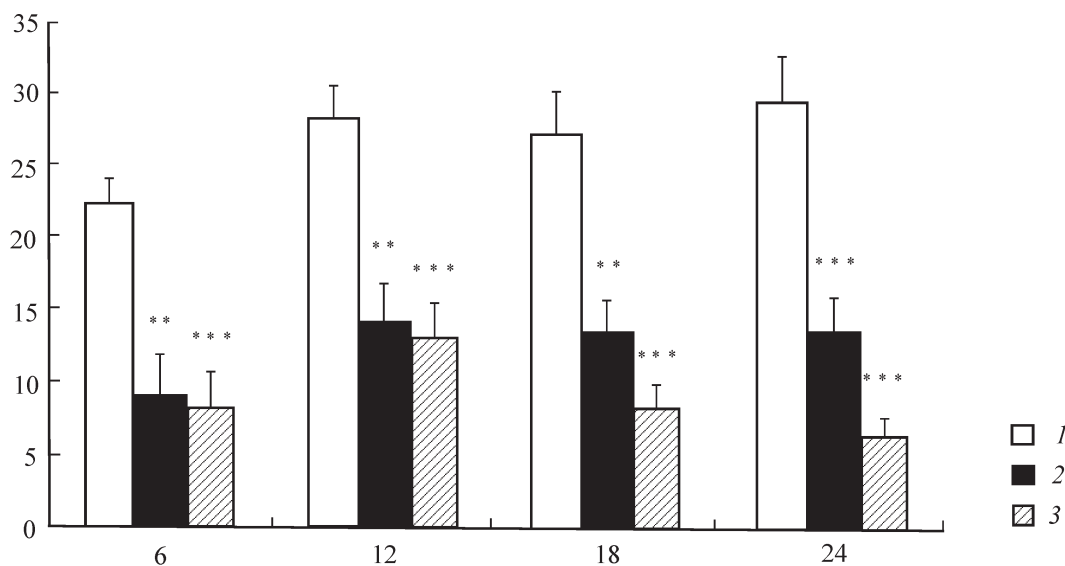


Рис. 3. Частота дегенерации хромосом в ооцитах при культивировании ОКК коров в средах, кондиционированных клетками гранулы коров.

По вертикали — доля ооцитов (%) с признаками дегенерации хромосом. Числа под столбиками — время культивирования, ч. Каждый столбик — среднее для 5 (6 ч), 4 (12 и 18 ч) или 6 экспериментов (24 ч). Две звездочки — достоверные различия по сравнению с контролем ($P < 0.01$); остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

Fig. 3. Frequency of chromosome degenerations in oocytes at bovine OCC culturing in media conditioned by bovine granulosa cells.

In the vertical — the share of oocytes with signs of chromosome degeneration, %. Digits under bars — culture duration, h. Each bar — the mean for 5 (6 h), 4 (12 and 18 h) or 6 experiments (24 h). ** $P < 0.01$. Other designations are the same as in Fig. 1.

gi, 1995). Показано также, что ПРЛ стимулирует *in vitro* секрецию клетками гранулезы свиней ингибитора созревания ооцитов — белка с мол. массой около 2 кДа, который тормозит реинициацию мейоза ооцитов свиней (Channing, Evans, 1982). У коров обнаружено стимулирующее влияние СТГ на продукцию инсулиноподобного фактора роста I (ИФР I) клетками гранулезы *in vitro* (Sirotkin, Makarevich, 1999). Хотя ИФР I не опосредует влияние СТГ на созревание ооцитов коров (Izadyar et al., 1997), нельзя исключить его участие в реализации влияния СТГ на пролиферацию кумулюсных клеток (Armstrong et al., 1996). Кроме того, показано, что ингибирующее влияние СТГ на апоптоз клеток кумулюса может опосредоваться ИФР I (Kölle et al., 2003).

При непосредственном действии СТГ и ПРЛ на культивируемые ОКК коров в отсутствие клеток гранулезы были обнаружены различные эффекты этих гормонов на половые и соматические клетки комплексов. Так, бычий ПРЛ не влиял на реинициацию мейоза в ооцитах, но стимулировал его завершение при созревании ОКК *in vitro* (Кузьмина и др., 2001), а также понижал уровень дегенерации хроматина в клетках кумулюса (Кузьмина и др., 1999). Внесение бычьего СТГ в среду культивирования ОКК приводило к ускорению возобновления и завершения мейоза ооцитов, стимуляции экспансии кумулюса и пролиферации кумулюсных клеток, а также к ингибированию их апоптоза (Izadyar et al., 1996; Kölle et al., 2003). Кроме того, наблюдали тормозящее влияние СТГ и ПРЛ на дегенерацию хромосом в окруженных кумулюсом ооцитах (Kuzmina, Pozdnyakova, 1996; Кузьмина и др., 2001). Сравнительный анализ этих данных и данных настоящего исследования показывает, что ряд эффектов СТГ и ПРЛ, опосредованных клетками гранулезы, отличается от таковых, выявленных при непосредственном действии гормонов на ОКК. Такое несоответствие согласуется с гипотезой Кузьминой и соавторов о том, что СТГ и ПРЛ могут оказывать дополнительное влияние на ОКК в присутствии клеток гранулезы, стимулируя продукцию ими паракринно действующих факторов, которые в свою очередь участвуют в регуляции созревания этих комплексов (Kuzmina et al., 1998; Кузьмина и др., 2001). Кроме того, в ответ на действие СТГ и ПРЛ клетки кумулюса, являющиеся субпопуляцией клеток гранулезы и также обладающие соматотропными и лактогенными рецепторами (Kölle et al., 1998; Лебедева и др., 2001), возможно, секретируют эти же факторы, действующие в данном случае аутокринно. В пользу этого предположения свидетельствует сходство некоторых гормональных эффектов на ОКК, наблюдаемых в кондиционированных средах, и эффектов СТГ и ПРЛ при непосредственном воздействии на эти комплексы в отсутствие клеток гранулезы (Кузьмина и др., 2001; Kölle et al., 2003).

Рядом авторов было показано, что у женщин и коров концентрация СТГ и ПРЛ в фолликулярной жидкости положительно связана с качеством зрелых ооцитов, что свидетельствует о возможном влиянии этих гормонов на жизнеспособность последних (Wise et al., 1994; Mendoza et al., 1999; Doldi et al., 2000; Mendes et al., 2001). Вместе с тем пути реализации такого действия СТГ и ПРЛ на ооциты остаются неясными. Нами было обнаружено, что *in vitro* обработка клеток гранулезы СТГ и ПРЛ приводит к последующему торможению реинициации мейоза ооцитов на ранней стадии их созревания и к одновременному снижению доли ооцитов с признаками дегенерации ядерного материала. При этом более быстрое возобнов-

ление мейоза было сопряжено с более высокой частотой дегенерации хромосом в ооцитах. Поэтому можно предположить, что кратковременное торможение реинициации мейоза в этих условиях обуславливало уменьшение хромосомных нарушений в ооцитах в процессе их последующего созревания. Однако такая связь между этими событиями, возможно, имеет место только *in vitro* и не существует при созревании ооцитов *in vivo*. Кроме того, нельзя исключить и другие механизмы регуляторного влияния СТГ и ПРЛ на качество хромосомного материала ооцитов, поскольку известно, что эти гормоны могут играть роль факторов выживания для фолликулярных клеток млекопитающих (Hull, Harvey, 2001; Perks et al., 2003).

В целом представленные данные показывают, что клетки гранулезы опосредуют, по крайней мере частично, влияние СТГ и ПРЛ на созревание ОКК коров *in vitro*, причем для проведения сигнала не требуется контакта между ОКК и гранулезными клетками. Это свидетельствует о возможном влиянии СТГ и ПРЛ на продукцию гранулезными клетками паракринно действующих факторов, которые в свою очередь участвуют в регуляции созревания ОКК.

Список литературы

- Кузьмина Т. И., Лебедева И. Ю., Торнер Х., Альм Х. 2001. Эффекты пролактина в различных системах культивирования на созревание ооцитов коров и их способность к дальнейшему развитию. Онтогенез. 32 (2) : 140—147.
- Кузьмина Т. И., Хелейн Б., Торнер Х., Альм Х. 1999. Влияние бычьего пролактина на морфологию ядер кумулюса ооцитов коров, выделенных из фолликулов разного диаметра, при их культивировании *in vitro*. В кн.: Разведение и генетика животных. Киев: Аграрна наука. 31—32 : 130—132.
- Лакин Г. Ф. 1990. Биометрия. М.: Высш. шк. 352 с.
- Лебедева И. Ю., Кузьмина Т. И., Гойло Т. А. 1995. Влияние пролактина на синтез ДНК в культивируемых клетках гранулезы коров. Цитология. 37 (3) : 220—226.
- Лебедева И. Ю., Кузьмина Т. И., Кибардина Т. В., Шонкин О. В., Шнайдер Ф., Альм Х., Торнер Х. 2004. Влияние соматотропина, пролактина и инсулина на клетки гранулезы из атретических фолликулов коров. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 90 (10) : 1281—1288.
- Лебедева И. Ю., Кузьмина Т. И., Лебедев В. А., Гойло Т. А. 2000. Взаимная модуляция регуляторного влияния пролактина и соматотропина на синтез ДНК в клетках гранулезы коров. Цитология. 42 (5) : 468—472.
- Лебедева И. Ю., Лебедев В. А., Кузьмина Т. И. 2001. Характеристика соматотропин- и пролактинсвязывающих участков на клетках гранулезы коров при использовании гомологичных гормонов. Биохимия. 66 (9) : 1188—1194.
- Эрнст Л. К., Свиридов Б. Е., Галиева Л. Д., Голубев А. К., Янушка А. Л., Пименова М. Н. 1980. Нарушение мейоза при культивировании ооцитов коров. Цитология. 22 (4) : 475—477.
- Эрнст Л. К., Янушка А. Л., Свиридов Б. Е., Галиева Л. Д., Пименова М. Н., Никитин А. И., Голубев А. К., Мамлеев Р. С. 1979. Культивирование фолликулярных ооцитов коров. Докл. ВАСХНИЛ. 4 : 27—28.
- Armstrong D. T., Xia P., de Gannes G., Tekpetey F. R., Khamisi F. 1996. Different effects of insulin-like growth factor-I and follicle stimulating hormone on proliferation and differentiation of bovine cumulus cells and granulosa cells. Biol. Reprod. 54 : 331—338.
- Bartke A. 1999. Role of growth hormone and prolactin in the control of reproduction: what are we learning from transgenic and knock-out animals? Steroids. 64 : 598—604.
- Bole-Feysot C., Goffin V., Edery M., Binart N., Kelly P. A. 1998. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction

pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrinol. Rev.* 19 : 225—268.

Channing C. P., Evans V. W. 1982. Stimulatory effect of ovine prolactin upon cultured porcine granulosa cell secretion of inhibitory activity of oocyte maturation. *Endocrinology.* 111 : 1746—1748.

Doldi N., Papaleo E., De Santis L., Ferrari A. 2000. Treatment versus no treatment of transient hyperprolactinemia in patients undergoing intracytoplasmic sperm injection programs. *Gynecol. Endocrinol.* 14 : 437—441.

Dong Y. J., Varisanga M. D., Mtango N. R., Aono M., Otoi T., Suzuki T. 2001. Improvement of the culture conditions for *in vitro* production of cattle embryos in a portable CO₂ incubator. *Reprod. Domest. Anim.* 36 : 313—318.

Doppler W. 1994. Regulation of gene expression by prolactin. In: Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag. 124 : 93—130.

Dusza L., Tilton J. E. 1990. Role of prolactin in the regulation of ovarian function in pigs. *J. Reprod. Fert.* 40 (Suppl.) : 33—45.

Folch J., Ramon J. P., Cocero M. J., Alabart J. L., Beckers J. F. 2001. Exogenous growth hormone improves the number of transferable embryos in superovulated ewes. *Theriogenology.* 55 : 1777—1785.

Hull K. L., Harvey S. 2001. Growth hormone: roles in female reproduction. *J. Endocrinol.* 168 : 1—23.

Izadyar F., Colenbrander B., Bevers M. M. 1996. *In vitro* maturation of bovine oocytes in the presence of growth hormone accelerates nuclear maturation and promotes subsequent embryonic development. *Mol. Reprod. Develop.* 45 : 372—377.

Izadyar F., Van Tol H. T. A., Colenbrander B., Bevers M. M. 1997. Stimulatory effect of growth hormone on *in vitro* maturation of bovine oocytes is exerted through cumulus cells and not mediated by IGF-I. *Mol. Reprod. Develop.* 47 : 175—180.

Kölle S., Sinowatz F., Boie G., Lincoln D. 1998. Developmental changes in the expression of the growth hormone receptor messenger ribonucleic acid and protein in the bovine ovary. *Biol. Reprod.* 59 : 836—842.

Kölle S., Stojkovic M., Boie G., Wolf E., Sinowatz F. 2003. Growth hormone-related effects on apoptosis, mitosis, and expression of connexin 43 in bovine *in vitro* maturation cumulus-oocyte complexes. *Biol. Reprod.* 68 : 1584—1589.

Kuzmina T. I., Lebedeva I. Yu., Torner H., Alm H., Denisenko V. Yu. 1999. Effects of prolactin on intracellular stored calcium in the course of bovine oocyte maturation *in vitro*. *Theriogenology.* 51 : 1363—1374.

Kuzmina T. I., Pozdnyakova T. 1996. Effects of recombinant bovine somatotropin on *in vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes. Proc. of the 47th Annual Meet. of EAAP. Norway. 43.

Kuzmina T. I., Torner H., Alm H. 1998. Effect of somatotropin on bovine oocyte maturation and early embryonic development in

different culture systems. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment.* 2 (Special issue) : 73.

Lebedeva I. Yu., Kuzmina T. I., Kibardina T. V., Schneider F., Alm H., Torner H. 2003. Granulosa cell-mediated actions of prolactin and somatotropin on bovine cumulus cells *in vitro*. Proc. of the 54th Annual Meet. of EAAP. Italy. 227.

Marchal R., Caillaud M., Martoriati A., Gérard N., Mermilod P., Goudet G. 2003. Effect of growth hormone (GH) on *in vitro* nuclear and cytoplasmic oocyte maturation, cumulus expansion, hyaluronan syntheses, and connexins 32 and 43 expression, and GH receptor messenger RNA expression in equine and porcine species. *Biol. Reprod.* 69 : 1013—1022.

Mendes M. C., Ferriani R. A., Sala M. M., Moura M. D., Carrara H. H., de Sa M. F. 2001. Effect of transitory hyperprolactinemia on *in vitro* fertilization of human oocytes. *J. Reprod. Med.* 46 : 444—450.

Mendoza C., Cremades N., Ruiz-Requena E., Martinez F., Ortega E., Bernabeu S., Tesarik J. 1999. Relationship between fertilization results after intracytoplasmic sperm injection, intrafollicular steroid, pituitary hormone and cytokine concentrations. *Hum. Reprod.* 14 : 628—635.

Perks C. M., Newcomb P. V., Grohmann M., Wright R. J., Mason H. D., Holly J. M. 2003. Prolactin acts as a potent survival factor against C2-ceramide-induced apoptosis in human granulosa cells. *Hum. Reprod.* 18 : 2672—2677.

Picazo R. A., Garcia Ruiz J. P., Santiago Moreno J., Gonzalez de Bulnes A., Munoz J., Silvan G., Lorenzo P. L., Illera J. C. 2004. Cellular localization and changes in expression of prolactin receptor isoforms in sheep ovary throughout the estrous cycle. *Reproduction.* 128 : 545—553.

Postel-Vinay M. C., Finidori J. 1995. Growth hormone receptor: structure and signal transduction. *Eur. J. Endocrinol.* 133 : 654—659.

Sirotkin A. V., Makarevich A. V. 1999. GH regulates secretory activity and apoptosis in cultured bovine granulosa cells through the activation of the cAMP/protein kinase A system. *J. Endocrinol.* 163 : 317—327.

Tarkowski A. 1966. An air-drying method for chromosomal preparation from mouse eggs. *Cytogenetic.* 1 : 394—400.

Wise T., Suss U., Stranzinger G., Wuthrich K., Maurer R. R. 1994. Cumulus and oocyte maturation and *in vitro* and *in vivo* fertilization of oocytes in relation to follicular steroids, prolactin, and glycosaminoglycans throughout the estrous period in superovulated heifers with a normal LH surge, no detectable LH surge, and progesterin inhibition of LH surge. *Domest. Anim. Endocrinol.* 11 : 59—86.

Yoshimura Y., Nakamura Y., Yamada H., Ando M., Ubukata Y., Oda T., Suzuki M. 1991. Possible contribution of prolactin in the process of ovulation and oocyte maturation. *Horm. Res.* 35 (Suppl. 1) : 22—32.

Поступила 10 II 2005

PARTICIPATION OF GRANULOSA CELLS IN MEDIATION OF PROLACTIN AND SOMATOTROPIN ACTION ON BOVINE OOCYTE-CUMULUS COMPLEXES *IN VITRO*

I. Yu. Lebedeva, T. V. Kibardina, T. I. Kuz'mina

All-Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding, St. Petersburg—Pushkin;
e-mail: irledv@mail.ru

Maturation of bovine oocyte-cumulus complexes (OCC) in media derived following granulosa cell culturing with prolactin (PRL, 50 ng/ml) and somatotropin (ST, 10 ng/ml) was studied. A medium conditioned by granulosa cells in the presence of PRL or ST exerted a stimulating effect on the proliferative activity of cumulus cells. ST introduction into the granulosa cell culture also caused a decrease in the rate of cumulus cells with degenerated chromatin at a subsequent OCC culturing. At the same time, the expansion of cumulus did not depend on hormone availability in the culture medium for granulosa cells. When OCC matured in conditioned media, a short-term inhibition of oocyte meiosis reinitiation (after 6 h of culturing) was revealed in both the experimental

groups, as compared to the control. Furthermore, the addition of ST and PRL to granulosa cell culture resulted in a subsequent decline in the rate of oocytes with signs of chromosome degeneration, observed as early as by 6 h of incubation and to be retained throughout the whole period of OCC culturing. In this case the earlier resumption of meiosis was associated with a higher rate of degeneration of the nuclear material in oocytes. The results of the present study suggest that granulosa cells may mediate, at least in part, PRL and ST impacts on *in vitro* maturation of bovine OCC, with no contact between OCC and granulosa cells being required for hormonal signaling.

Key words: prolactin, somatotropin, granulosa cells, oocytes, cumulus cells, *in vitro* maturation, meiosis.
