

МОДУЛЯЦИЯ ПРОЛАКТИНОМ ИНГИБИРУЮЩЕГО ВЛИЯНИЯ ТЕОФИЛЛИНА НА СОЗРЕВАНИЕ ООЦИТ-КУМУЛЮСНЫХ КОМПЛЕКСОВ КОРОВ *IN VITRO*

© И. Ю. Лебедева, О. С. Скотти, Т. И. Кузьмина

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

При использовании модели *in vitro* культивирования проведено сравнительное исследование индивидуального и совместного влияния пролактина (ПРЛ, 50 нг/мл) и теофиллина (ТФ) — неселективного ингибитора фосфодиэстераз — на ядерное созревание ооцитов коров и экспансию клеток кумулюса, окружающих ооциты. Показано, что ТФ (5 мМ) оказывает кратковременное тормозящее влияние на реинициацию мейоза ооцитов и блокирует его на стадиях диакинеза и метафазы I, а также ингибирует экспансию кумулюса. Внесение ПРЛ в среду, содержащую ТФ, обуславливало снижение доли ооцитов, находящихся на стадии диплотены, через 6 ч культивирования и повышение доли ооцитов, достигших завершающих стадий созревания, — через 24 ч. Кроме того, ПРЛ частично подавлял ингибирующее влияние ТФ на экспансию кумулюсных клеток. Полученные данные свидетельствуют о сопряжении сигнального каскада, индуцированного ПРЛ в ооцит-кумулясных комплексах коров, и цАМФ-зависимого внутриклеточного пути.

Ключевые слова: пролактин, теофиллин, цАМФ, ооциты, клетки кумулюса, созревание *in vitro*, мейоз.

Принятые сокращения: ОКК — ооцит-кумулясные комплексы, ПРЛ — пролактин, ТФ — теофиллин, Дп — диплотена, Дк — диакинез, МI — метафаза I, АI — анафаза I, ТI — телофаза I, МII — метафаза II.

Исследования последних лет показали, что пролактин (ПРЛ) является одним из наиболее важных регуляторов овариальной функции млекопитающих, в том числе процесса формирования зрелых яйцеклеток (Bole-Feysot et al., 1998; Bartke, 1999; Mendes et al., 2001). С этой точкой зрения согласуются данные о наличии лактогенных рецепторов или их мРНК в фолликулярных клетках, включая ооциты, у различных видов животных (Лебедева и др., 2001; Vlahos et al., 2001; Picazo et al., 2004; Kiarekou et al., 2005). Вместе с тем пути проведения сигнала ПРЛ в половые и соматические клетки овариальных фолликулов млекопитающих практически не изучены.

Механизмы реализации действия ПРЛ были исследованы главным образом в клетках молочной железы и иммунной системы. Было показано, что активация лактогенных рецепторов происходит в результате их связывания с лигандом, которое сопровождается рецепторной димеризацией (Goffin et al., 2002). После взаимодействия ПРЛ с рецепторами происходит быстрое фосфорилирование по тирозину ассоциированной с рецепторами киназы Jak2 (Janus kinase 2) и самих рецепторов, а также активация белка Stat5 (signal transducer and activator of transcription 5), MAP (mitogen-activated protein) киназы и ряда других трансдуцирующих белков (Bole-Feysot et al., 1998; Goffin et al., 2002). Вместе с тем было обнаружено, что не все эффекты ПРЛ могут быть блокированы ингибиторами тирозинового фосфорилирования. Были

идентифицированы и другие вторичные посредники, например протеинкиназа С, протеинкиназа В и ионы Ca^{2+} (Bole-Feysot et al., 1998; Secondo et al., 2003). Ряд данных указывает на то, что влияние ПРЛ на клетки яичника может опосредоваться цАМФ-зависимыми внутриклеточными механизмами, причем передача гормонального сигнала связана с модуляцией синтеза или деградации цАМФ (Gitay-Goren et al., 1989; Krasnow et al., 1990; Sirotkin, Nitray, 1994), который играет ключевую роль в регуляции мейоза ооцитов млекопитающих (Conti et al., 2002).

При использовании модели *in vitro* культивирования ранее нами было обнаружено позитивное влияние ПРЛ на созревание окруженных кумулюсом ооцитов коров, а также на их способность к дальнейшему развитию после оплодотворения (Kuzmina et al., 1999; Кузьмина и др., 2001). При этом было показано, что тормозящее влияние ПРЛ на процессы, связанные с дегенерацией хромосом в ооцитах коров, опосредуется, по крайней мере частично, путем освобождения ионов Ca^{2+} из внутриклеточных депо ооцитов (Kuzmina et al., 1999). Напротив, стимулирующее влияние гормона на ядерное созревание ооцитов не было связано с модуляцией содержания депонированного Ca^{2+} . Это свидетельствует о функционировании различных путей проведения сигнала ПРЛ в ооциты.

В представленной работе была исследована *in vitro* взаимосвязь между сигнальным каскадом, индуцирован-

ным ПРЛ в ооцит-кумулясных комплексах (ОКК), и цАМФ-зависимым внутриклеточным механизмом, регулирующим созревание последних. С этой целью был проведен сравнительный анализ индивидуального и совместного действия ПРЛ и теофиллина (ТФ), неселективного ингибитора фосфодиэстераз, отвечающих за деградацию цАМФ, на ядерное созревание ооцитов коров и экспансию клеток кумулюса, окружающих ооциты. Пролактин был использован в концентрации 50 нг/мл, в которой он оказывал стимулирующее влияние на созревание ооцитов коров (Кузьмина и др., 2001).

Материал и методика

Объектом исследования служили ОКК из антральных фолликулов яичников коров и половозрелых телок. Использовали полученные на мясокомбинате яичники без видимых признаков патологии, находящиеся на стадии фолликулярного роста и рассасывающегося желтого тела. Яичники доставляли в лабораторию при 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).

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

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 10—15 шт. в каплях 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 и 24 ч. В качестве контроля использовали среду ТС-199, содержащую 10 % фетальной бычьей сыворотки, 0.55 мг/мл лактата кальция, 0.23 мг/мл пирувата натрия и 50 мкг/мл гентамицина. В подопытных группах в среду вносили ТФ (2.5, 5.0 или 10.0 мМ), ПРЛ (50 нг/мг) или одновременно ТФ (5 мМ) и ПРЛ (50 нг/мл). Все ма-

нипуляции с ОКК, а также их морфологическую оценку проводили под стереомикроскопом МБС-9.

После культивирования в течение 24 ч ОКК оценивали морфологически в соответствии с описанными ранее критериями степени экспансии кумулюса (Calder et al., 2001) и делили на три категории: I — ОКК без экспансии кумулюса или с разрыхлением только периферического слоя клеток, II — ОКК с разрыхлением внешних слоев кумулюсных клеток, III — ОКК с разрыхлением внешних и внутренних слоев кумулюса.

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 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 от 4 до 5 раз. Статистический анализ проводили на компьютере по программе SigmaStat. Данные обрабатывали методом однофакторного дисперсионного анализа, достоверность различия сравниваемых средних значений оценивали с использованием критерия Тьюки (Лаккин, 1990), при этом был принят уровень значимости $P < 0.05$. Для сравнения результатов созревания ооцитов в средах, содержащих различную концентрацию теофиллина, использовали критерий χ^2 .

Результаты

Предварительные исследования показали, что ядерное созревание ооцитов коров зависит от содержания ТФ в среде культивирования ОКК (см. таблицу). Теофиллин в концентрациях 5 и 10 мМ оказывал ингибирующее влияние на мейоз ооцитов, причем большая часть клеток была блокирована на стадиях диакинеза и метафазы I. При этом ТФ не влиял на частоту дегенерации хромосом в ооцитах. В дальнейших исследованиях ингибитор фосфодиэстераз был использован в концентрации 5 мМ, поскольку это была минимальная концентрация, при которой достигалось достоверное ингибирование завершения ядерного созревания ооцитов.

Влияние теофиллина в различных концентрациях на ядерное созревание ооцитов коров (время культивирования 24 ч)

| Концентрация теофиллина, мМ | Число исследованных ооцитов | Доля ооцитов на стадиях мейоза, % | | | | Доля ооцитов с дегенерированным хроматином, % |
|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|------------------------|---------|------------------------|---|
| | | Дп | Дк + МI | АI | ТI + МII | |
| 0 | 37 | 4 (10.8) | 8 (21.6) ^a | 2 (5.4) | 23 (62.2) ^a | 11 (29.7) |
| 2.5 | 21 | 1 (4.8) | 9 (42.9) | 1 (4.8) | 10 (47.6) | 7 (33.3) |
| 5.0 | 41 | 1 (2.4) | 32 (78.0) ^b | 2 (4.9) | 6 (14.6) ^b | 12 (29.3) |
| 10.0 | 26 | 0 (0) | 26 (100) | 0 (0) | 0 (0) | 11 (42.3) |

^{a,b} Достоверные различия между сравниваемыми значениями ($P < 0.001$).

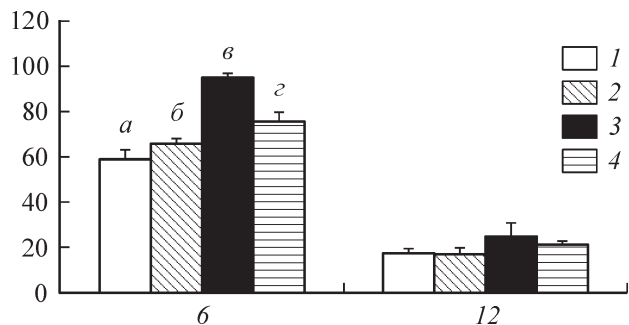


Рис. 1. Реинициация мейоза ооцитов при культивировании ОКК коров в присутствии ПРЛ и ТФ.

По вертикали — доля ооцитов (%), находящихся на стадии диплотены. Числа под столбиками — время культивирования, ч. Каждый столбик — среднее для 4 экспериментов. Вертикальные отрезки — стандартные ошибки средних значений. Системы культивирования: контроль (1), 50 нг/мл ПРЛ (2), 5 мМ ТФ (3), 50 нг/мл ПРЛ + 5 мМ ТФ (4). Буквы над столбиками показывают достоверные различия между сравниваемыми средними значениями: а, вР < 0.001, б, вР < 0.001, в, г Р < 0.01, а, гР < 0.05.

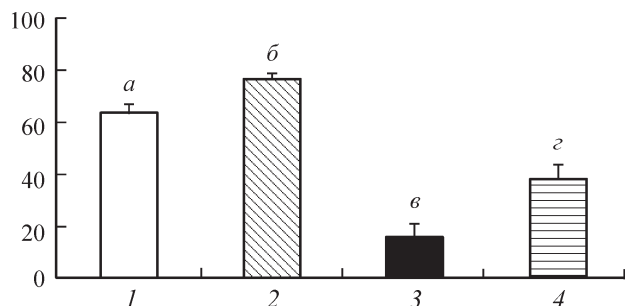


Рис. 2. Ядерное созревание ооцитов при культивировании ОКК коров в присутствии ПРЛ и ТФ в течение 24 ч.

По вертикали — доля ооцитов (%), находящихся на стадии телофазы I или метафазы II. Числа под столбиками — системы культивирования. Каждый столбик — среднее для 4 экспериментов. Достоверные различия между сравниваемыми средними значениями: а, бР < 0.05, а, вР < 0.001, б, вР < 0.001, в, гР < 0.001, а, гР < 0.01, а, гР < 0.05. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

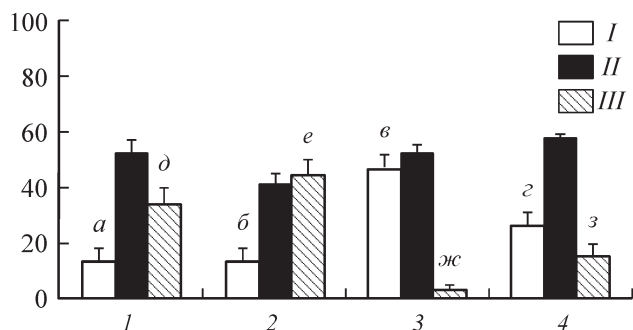


Рис. 3. Экспансия кумулюса при культивировании ОКК коров в присутствии ПРЛ и ТФ в течение 24 ч.

По вертикали — доля ОКК (%) с различной степенью экспансии кумулюса: низкой (I), средней (II) или высокой (III). Числа под столбиками — системы культивирования. Каждый столбик — среднее для 5 экспериментов. Достоверные различия между сравниваемыми средними значениями: а, вР < 0.001, б, вР < 0.001, в, гР < 0.05, д, жР < 0.01, е, жР < 0.001, е, зР < 0.01. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

Для изучения влияния ПРЛ и ТФ на реинициацию мейоза ооцитов коров ОКК культивировали в течение 6 и 12 ч (рис. 1). Было обнаружено, что добавление ТФ в среду созревания приводит к повышению доли ооцитов, находящихся на стадии диплотены, через 6 ч инкубации по сравнению с контролем ($P < 0.001$). Это тормозящее влияние ТФ на возобновление мейоза ооцитов уменьшалось при культивировании ОКК в присутствии ПРЛ, хотя последний не влиял на реинициацию мейоза в контрольной среде. Внесение ПРЛ в среду, содержащую ТФ, обуславливало снижение числа ооцитов на стадии диплотены по сравнению с группой ОКК, культивируемых в присутствии одного ТФ ($P < 0.01$). Ингибирование реинициации мейоза ооцитов коров в присутствии ТФ было кратковременным и не наблюдалось через 12 ч созревания, что подтверждалось отсутствием достоверных различий между исследуемыми группами.

При культивировании ОКК коров в группе с ТФ в течение 24 ч доля ооцитов, достигших стадии телофазы I или метафазы II, была в 4 раза меньше ($P < 0.001$), чем в контроле (рис. 2). Напротив, ПРЛ стимулировал завершение ядерного созревания ооцитов, культивируемых в контрольной среде ($P < 0.05$). Внесение ПРЛ в среду с ТФ также приводило к повышению доли ооцитов на завершающих стадиях созревания ($P < 0.05$). Тем не менее в этой группе доля созревших ооцитов была значительно ниже, чем в группе с одним ПРЛ ($P < 0.001$).

Морфологическая оценка ОКК после 24-часового периода культивирования показала, что экспансия кумулюса зависит от наличия ТФ и ПРЛ в среде созревания (рис. 3). Было обнаружено, что в присутствии ТФ снижается доля ОКК с высокой степенью разрыхления кумулюса ($P < 0.01$) и повышается доля ОКК с низкой степенью разрыхления ($P < 0.001$). В отсутствие ТФ не было выявлено значительного стимулирующего влияния ПРЛ на экспансию кумулюсных клеток. Однако одновременное внесение в среду ТФ и ПРЛ приводило к уменьшению доли ОКК с низкой степенью кумулюсной экспансии по сравнению с группой ОКК, обработанных ТФ ($P < 0.05$). В то же время доля ОКК с высокой степенью разрыхления кумулюса в среде с ПРЛ и ТФ не отличалась от таковой в среде с ТФ и была достоверно ниже, чем при воздействии одного ПРЛ ($P < 0.01$).

Обсуждение

В работах различных исследователей было убедительно показано, что цАМФ играет ключевую роль в регуляции мейоза ооцитов млекопитающих, однако механизм его действия до сих пор остается неясным (Conti et al., 2002). В соответствии с общепринятой гипотезой высокая концентрация этого циклического нуклеотида в ооцитах обуславливает торможение реинициации мейоза. Действительно, удаление ОКК из овариальных фолликулов, компоненты которых, как установлено, ингибируют возобновление мейоза (Ayoub, Hunter, 1993; Richard, Sirard, 1996), приводит к быстрому снижению уровня цАМФ в ооцитах и кумулюсных клетках (Luciano et al., 2004). Добавление производных цАМФ, активатора аденилатциклазы форсколина или неселективного ингибитора фосфодиэстераз 3-изобутил-1-метилксантин в среду культивирования ОКК связано с полным или кратковременным блокированием реинициации мейоза в зависимости от вида исследуемых животных (Hinrichs,

1996). Вместе с тем в отсутствие реагентов, поддерживающих высокую внутриклеточную концентрацию цАМФ, ее кратковременное повышение в ооцитах может индуцировать их ядерное созревание *in vitro* (Yoshimura et al., 1992; Luciano et al., 2004). В этой связи авторами было выдвинуто предположение о том, что относительное изменение концентрации цАМФ в ооцитах имеет большее значение для реинициации мейоза, чем его абсолютная концентрация. Кроме того, при культивировании ОКК свиней было обнаружено, что понижение уровня цАМФ в ооцитах после возобновления мейоза необходимо для его продвижения от стадии метафазы I до стадии метафазы II (Shimada, Terada, 2002). Снижение внутриклеточной концентрации цАМФ наблюдали также после инициации *in vitro* ядерного созревания ооцитов кроликов (Yoshimura et al., 1992) и коров (Luciano et al., 2004).

В представленной работе внесение ТФ — неселективного ингибитора фосфодиэстераз — в среду созревания ОКК вызывало кратковременное ингибирование реинициации мейоза и приводило к его блокированию на стадиях диакинеза и метафазы I, что согласуется с данными о действии реагентов, поддерживающих высокую внутриклеточную концентрацию цАМФ, на ооциты коров (Sirard, First, 1988). Это позволяет предположить, что ТФ подобно 3-изобутил-1-метилксантину (Rose-Hellekant, Bavister, 1996; Shimada, Terada, 2002) тормозил падение уровня цАМФ в ооцитах, достаточное для реинициации мейоза, и в дальнейшем блокировал его снижение, необходимое для перехода ооцитов из стадии метафазы I в стадию метафазы II. Такое действие ТФ могло бы реализовываться путем ингибирования фосфодиэстераз, вовлеченных в регуляцию мейоза, например фосфодиэстеразы 3, идентифицированной в ооцитах коров (Mayes, Sirard, 2002).

Нами было обнаружено, что ингибирующее влияние ТФ на мейоз ооцитов коров ослабляется в присутствии ПРЛ. При этом гормон не влиял на возобновление мейоза и стимулировал завершение ядерного созревания ооцитов в контрольной среде, как уже наблюдалось нами ранее в сходных культуральных системах (Кузьмина и др., 2001; Kuzmina et al., 1999). Таким образом, мейозиндуцирующее действие ПРЛ реализуется в мейозингибирующих условиях, тогда как гормональная стимуляция завершения созревания происходит независимо от таких условий. Это свидетельствует о том, что сигнал ПРЛ, передаваемый в ооцит, может вызывать снижение уровня цАМФ, преодолевая, по крайней мере частично, ингибирующее действие ТФ. По-видимому, цАМФ-понижающее влияние ПРЛ на ооциты в стадии диплотены в большей степени зависит от внутриклеточной концентрации этого циклического нуклеотида, чем на ооциты, реиницировавшие мейоз.

В настоящее время известно, что цАМФ-зависимые внутриклеточные механизмы также вовлечены в регуляцию экспансии кумулюса, которая сопутствует созреванию ооцитов млекопитающих (Ochsner et al., 2003; Luciano et al., 2004). Наиболее эффективным стимулятором разрыхления кумулюсных клеток является фолликулостимулирующий гормон, действующий путем активации аденилатциклазы (Mattioli, 1994). Вместе с тем было показано, что вслед за кратковременным повышением концентрации цАМФ в ОКК коров, культивируемых в присутствии гонадотропных гормонов, происходит ее снижение, которое сопровождает экспансию кумулюса (Luciano et al., 2004). Таким образом, разрыхление куму-

люсных клеток, по-видимому, связано с понижением внутриклеточной концентрации цАМФ, по крайней мере после инициации данного процесса. Это предположение согласуется с наблюдаемым нами торможением кумулюсной экспансии при культивировании ОКК коров в присутствии ТФ. Результаты настоящего исследования также показали, что ПРЛ ингибирует, по крайней мере частично, тормозящее влияние ТФ на экспансию клеток кумулюса. В этой связи можно предположить, что действие ПРЛ на кумулюсные клетки, как и на ооциты, приводит к снижению в них уровня цАМФ. Поскольку ПРЛ не влиял существенно на экспансию кумулюса в отсутствие ТФ, это свидетельствует о зависимости гормонального действия от внутриклеточной концентрации цАМФ.

Вопрос о путях проведения сигнала ПРЛ в ооциты коров остается открытым. Выявленное нами стимулирующее влияние ПРЛ на созревание ОКК могло бы реализовываться через клетки кумулюса, которые являются субпопуляцией клеток гранулезы, обладающих лактогенными рецепторами (Лебедева и др., 2001), и связаны с ооцитом щелевыми контактами. Нельзя исключить и прямое воздействие ПРЛ на ооциты, поскольку экспрессия мРНК для рецепторов ПРЛ выявлена в ооцитах овец (Picazo et al., 2004) и мышей (Kiarekou et al., 2005). Также у свиней было обнаружено стимулирующее влияние этого гормона на освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо ооцитов, лишенных кумулюсных клеток, причем данный эффект опосредовался путем активации протеинкиназы C (Денисенко, Кузьмина, 2002), которая является хорошо известным мессенджером действия ПРЛ на различные соматические клетки, в том числе фолликулярные (Bole-Feysot et al., 1998; Ciereszko et al., 2003). Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о том, что протеинкиназа C могла бы быть вовлечена и в опосредование цАМФ-модулирующего действия ПРЛ на ОКК коров, поскольку, как известно, активация лактогенных рецепторов в клетках млекопитающих не сопряжена с активацией аденилатциклазы (Bole-Feysot et al., 1998). Так, было показано *in vitro*, что протеинкиназа C индуцирует реинициацию мейоза в ооцитах коров (Rose-Hellekant, Bavister, 1996), тогда как ее ингибирование в ОКК свиней обуславливает повышение концентрации цАМФ в ооцитах и блокирование мейоза на стадии метафазы I (Shimada, Terada, 2002). Основываясь на выявленном нами модулирующем влиянии ПРЛ на действие ТФ, можно предположить, что сигнальный каскад, индуцированный гормоном в ОКК коров, приводит в итоге к активации фосфодиэстераз 3 и 4, которые регулируют деградацию цАМФ соответственно в ооцитах и кумулюсных клетках (Mayes, Sirard, 2002). Таким образом, необходимы дальнейшие исследования, направленные на идентификацию сигнальных путей, вовлеченных в опосредование влияния ПРЛ на созревание ОКК коров.

В целом результаты представленной работы показывают, что ТФ оказывает кратковременное тормозящее влияние на реинициацию мейоза ооцитов коров и блокирует его на стадиях диакинеза и метафазы I, а также ингибирует экспансию клеток кумулюса. При этом ПРЛ частично подавляет ингибирующее влияние ТФ на ядерное созревание ооцитов и экспансию кумулюса, что свидетельствует о сопряжении сигнального каскада, индуцированного ПРЛ в ОКК коров, и цАМФ-зависимого внутриклеточного пути.

Список литературы

- Денисенко В. Ю., Кузьмина Т. И. 2002. Участие протеинкиназы С в регуляции стимулированного пролактином освобождения Ca^{2+} из внутриклеточных депо ооцитов свиней. Цитология. 44 (6) : 551—554.
- 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.
- Лакин Г. Ф. 1990. Биометрия. М.: Высш. шк. 352 с.
- Лебедева И. Ю., Лебедев В. А., Кузьмина Т. И. 2001. Характеристика соматотропин- и пролактинсвязывающих участков на клетках гранулы коров при использовании гомологичных гормонов. Биохимия. 66 (9) : 1188—1194.
- Эрст 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.
- Эрст 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.
- Ayoub M. A., Hunter A. G. 1993. Inhibitory effect of bovine follicular fluid on *in vitro* maturation of bovine oocytes. J. Dairy Sci. 76 : 95—100.
- 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.
- Calder M. D., Caveney A. N., Westhusin M. H., Watson A. J. 2001. Cyclooxygenase-2 and prostaglandin E_2 receptor messenger RNAs are affected by bovine oocyte maturation time and cumulus-oocyte complex quality, and PGE_2 induces moderate expansion of the bovine cumulus *in vitro*. Biol. Reprod. 65 : 135—140.
- Ciereszko R., Opalka M., Kaminska B., Gorska T., Dusza L. 2003. Prolactin signalling in porcine theca cells: the involvement of protein kinases and phosphatases. Reprod. Fertil. Develop. 15 : 27—35.
- Conti M., Andersen C. B., Richard F., Mehats C., Chun S.-Y., Horner K., Jin C., Tsafiriri A. 2002. Role of cyclic nucleotide signalling in oocyte maturation. Mol. Cell. Endocrinol. 187 : 153—159.
- Gitay-Goren H., Lindenbaum E. S., Kraem Z. 1989. Prolactin inhibits HCG-stimulated steroidogenesis and cyclic AMP accumulation possibility by increasing phosphodiesterase activity in rat granulosa cell cultures. Mol. Cell. Endocrinol. 61 : 69—76.
- Goffin V., Binart N., Touraine P., Kelly P. A. 2002. Prolactin: the new biology of an old hormone. Annu. Rev. Physiol. 64 : 47—67.
- Hinrichs K. 1996. Manipulation of oocyte maturation *in vitro*. Arch. Anim. Breed. 39 (Special issue) : 43—50.
- Kiapekou E., Loutradis D., Patsoula E., Koussidis G. A., Minas V., Bletsas R., Antsaklis A., Michalas S., Makrigiannakis A. 2005. Prolactin receptor mRNA expression in oocytes and preimplantation mouse embryos. Reprod. Biomed. Online. 10 : 339—346.
- Krasnow J. S., Hickey G. L., Richards J. S. 1990. Regulation of aromatase messenger RNA and estradiol biosynthesis in rat ovarian granulosa and luteal cells by prolactin. Mol. Endocrinol. 4 : 13—21.
- 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.
- Luciano A. M., Modina S., Vassena R., Milanesi E., Lauria A., Gandolfi F. 2004. Role of intracellular cyclic adenosine 3',5'-monophosphate concentration and oocyte-cumulus cells communications on the acquisition of the developmental competence during *in vitro* maturation of bovine oocyte. Biol. Reprod. 70 : 465—472.
- Mattioli M. 1994. Transduction mechanisms for gonadotropin-induced oocyte maturation. Zygote. 2 : 347—349.
- Mayer M. A., Sirard M. A. 2002. Effect of type 3 and type 4 phosphodiesterase inhibitors on the maintenance of bovine oocytes in meiotic arrest. Biol. Reprod. 66 : 180—184.
- 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.
- Ochsner S. A., Day A. J., Rugg M. S., Breyer R. M., Gomer R. H., Richards J. S. 2003. Disrupted function of tumor necrosis factor- α -stimulated gene 6 blocks cumulus cell-oocyte complex expansion. Endocrinology. 144 : 4376—4384.
- 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.
- Richard F. J., Sirard M. A. 1996. Effect of follicular cells on oocyte maturation. I. Effects of follicular hemisections on bovine oocyte maturation *in vitro*. Biol. Reprod. 54 : 16—21.
- Rose-Hellekant T. A., Bavister B. D. 1996. Roles of protein kinase A and C in spontaneous maturation and in forskolin or 3-isobutyl-methylxanthine maintained meiotic arrest of bovine oocytes. Mol. Reprod. Develop. 44 : 241—249.
- Secondo A., Sirabella R., Formisano L., D'Alessio A., Castaldo P., Amoroso S., Ingleton P., Di Renzo G., Annunziato L. 2003. Involvement of PI3'-K, mitogen-activated protein kinase and protein kinase B in the up-regulation of the expression of nNOS α and nNOS β splicing variants induced by PRL-receptor activation in GH3 cells. J. Neurochem. 84 : 1367—1377.
- Shimada M., Terada T. 2002. Roles of cAMP in regulation of both MAP kinase and p34 (cdc2) kinase activity during meiotic progression, especially beyond the MI stage. Mol. Reprod. Develop. 62 : 124—131.
- Sirard M. A., First N. L. 1988. *In vitro* inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine. Biol. Reprod. 39 : 229—234.
- Sirotkin A. V., Nitray J. 1994. Effects of prolactin on estrogen, cAMP and oxytocin secretion by porcine granulosa cells *in vitro*. Reprod. Nutr. Develop. 34 : 141—148.
- Tarkowski A. 1966. An air-drying method for chromosomal preparation from mouse eggs. Cytogenetic. 1 : 394—400.
- Vlahos N. P., Bugg E. M., Shambloot M. J., Phelps J. Y., Gearhart J. D., Zacur H. A. 2001. Prolactin receptor gene expression and immunolocalization of the prolactin receptor in human luteinized granulosa cells. Mol. Hum. Reprod. 7 : 1033—1038.
- Yoshimura Y., Nakamura Y., Oda T., Ando M., Ubukata Y., Karube M., Koyama N., Yamada H. 1992. Induction of meiotic maturation of follicle-enclosed oocytes of rabbits by a transient increase followed by an abrupt decrease in cyclic AMP concentration. J. Reprod. Fertil. 95 : 803—812.

PROLACTIN MODULATION OF THEOPHYLLINE INHIBITORY ACTION ON MATURATION
OF BOVINE OOCYTE-CUMULUS COMPLEXES *IN VITRO*

I. Yu. Lebedeva, O. S. Skotti, T. I. Kuzmina

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

The comparative investigation of the individual and joint impact of prolactin (PRL, 50 ng/ml) and theophylline (TP), a nonselective inhibitor of phosphodiesterases, on nuclear maturation of bovine oocytes and the expansion of cumulus cells enclosing the oocytes was carried out using a model of *in vitro* culturing. It has been shown that TP (5 mM) exerts a short-term inhibitory action on oocyte meiosis reinitiation and blocks it at diakinesis and metaphase I stages as well as inhibits the cumulus expansion. The addition of PRL to the medium containing TP caused the decrease in the rate of oocytes at diplotene stage after 6 h of culturing and the increase in the rate of oocytes attained the closing stages of maturation after 24 h of culturing. Furthermore, PRL suppressed partly the inhibitory impact of TP on the expansion of cumulus cells. The data obtained suggest the signal cascade induced by PRL in bovine oocyte-cumulus complexes to be coupled with cAMP-dependent intracellular pathway.

Key words: prolactin, theophylline, cAMP, oocytes, cumulus cells, *in vitro* maturation, meiosis.

—————