

## ВЛИЯНИЕ ИНГИБИРОВАНИЯ РИАНОДИНОВЫХ И IP<sub>3</sub>-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ РЕЦЕПТОРОВ, А ТАКЖЕ ПРОТЕИНКИНАЗЫ С НА ОСВОБОЖДЕНИЕ CA<sup>2+</sup> ИЗ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ДЕПО ООЦИТОВ СВИНЕЙ ПРИ ИХ АКТИВАЦИИ ПРОЛАКТИНОМ И GTP

© В. Ю. Денисенко, Т. И. Кузьмина<sup>1</sup>

*Всероссийский научно-исследовательский институт генетики  
и разведения сельскохозяйственных животных РАСХН, Санкт-Петербург—Пушкин;*

<sup>1</sup> электронный адрес: tkuzmina@rol.ru

С помощью Ca<sup>2+</sup>-чувствительного зонда хлортетрациклина (ХТЦ) изучали влияние ингибиторов внутриклеточных рецепторов освобождения кальция и протеинкиназы С (РКС) на стимулированное пролактином и GTP освобождение Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных депо ооцитов свиней, выделенных из яичников на стадии желтого тела. В бескальциевой среде освобождение Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных депо при активации пролактином (5 или 50 нг/мл) снижалось при обработке ооцитов ингибитором IP<sub>3</sub>-рецепторов гепарином, но не зависело от ингибирования рианодинных рецепторов рутениевым красным. Ингибирование РКС не влияло на стимулированное пролактином освобождение Ca<sup>2+</sup>. GTP в ооцитах свиньи не активировал освобождение Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных депо, ингибиторы кальциевых каналов и РКС не влияли на этот процесс. При совместном действии пролактина и GTP не отмечали дополнительного освобождения Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных депо в обработанных и не обработанных ингибитором РКС ооцитах. Полученные данные свидетельствуют об активации IP<sub>3</sub>-чувствительных рецепторов при действии пролактина и отсутствии влияния на кальциевые рецепторы GTP.

Ключевые слова: GTP, пролактин, кальций, ооциты свиньи.

Принятые сокращения: РКС — протеинкиназа С, ХТЦ — хлортетрациклин, IP<sub>3</sub> — инозитол-1,4,5-трифосфат.

Подъем концентрации цитозольного кальция является фундаментальным механизмом контроля за многими формами клеточной активности от оплодотворения до смерти (Clapham, 1995; Thomas et al., 1996). Увеличение концентрации цитозольного кальция ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>in</sub>) происходит вследствие освобождения Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных депо. Одним из наиболее важных внутриклеточных депо во многих клетках является эндоплазматический (саркоплазматический) ретикулум. Активация рианодинных и IP<sub>3</sub>-рецепторов, расположенных в эндоплазматическом ретикулуме, приводит к снижению концентрации Ca<sup>2+</sup> во внутриклеточных депо и увеличению ее в цитозоле клеток (Berridge, 2002). В ооцитах свиней имеются рецепторы обоих типов — IP<sub>3</sub>- и рианодин-чувствительные (Machaty et al., 1997). Для ингибирования освобождения Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных депо, вызванного активацией IP<sub>3</sub>-чувствительных рецепторов, широко используется гепарин (Ghosh et al., 1988), а для ингибирования рианодин-чувствительных рецепторов наряду с другими ингибиторами используется рутениевый красный (Yue et al., 1995).

В одних работах показано, что активация рецепторов пролактина не стимулирует метаболизм фосфоинозитидов (Gertler, Friesen, 1986), в то же время в других отмечают, что при действии пролактина в клетках на короткое время увеличивается концентрация IP<sub>3</sub> (Ratovondra-

hona et al., 1998). Есть данные, свидетельствующие об активации протеинкиназы С (РКС) при действии пролактина, например, в клетках молочной железы мыши (Vanejee, Vonderhaar, 1992).

GTP в клетках печени стимулирует освобождение Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных депо, вызванное IP<sub>3</sub> (Dawson et al., 1986; Thomas, 1988). В то же время в микросомах из клеток околушной железы и в пермеабилитованных клетках нейробластомы N1E-115 GTP вызывал освобождение Ca<sup>2+</sup> из немитохондриальных депо сам по себе даже в отсутствие IP<sub>3</sub> (Gill et al., 1986; Henne, Soling, 1986). Кроме того, существует предположение о том, что GTP способен образовывать связь между IP<sub>3</sub>-нечувствительными и IP<sub>3</sub>-чувствительными внутриклеточными депо Ca<sup>2+</sup> (Mullaney et al., 1987).

Целью работы является исследование влияния ингибиторов рианодинных и IP<sub>3</sub>-рецепторов, а также РКС на освобождение Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных депо ооцитов свиньи при их активации пролактином и GTP.

### Материал и методика

Использовали яичники свиней породы ландрас на стадии желтого тела без видимой патологии. В яичниках с помощью лезвия разрезали фолликулы диаметром

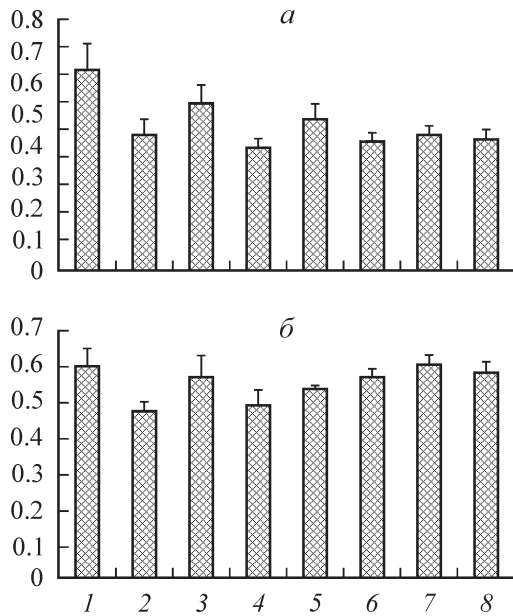


Рис. 1. Влияние ингибитора  $IP_3$ -чувствительных рецепторов на стимулированное пролактином освобождение  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо ооцитов свиней.

По горизонтали: 1 — контроль (необработанные ооциты), 2 — обработка пролактином, 3 — действие ингибитора  $IP_3$ -чувствительных рецепторов гепарина (0.1 мг/мл), 4 — 0.1 мг/мл гепарина с последующей обработкой пролактином, 5 — 1.0 мг/мл гепарина, 6 — 1.0 мг/мл гепарина с последующей обработкой пролактином, 7 — 10.0 мг/мл гепарина, 8 — 10.0 мг/мл гепарина с последующей обработкой пролактином. По вертикали — интенсивность флуоресценции ХТЦ, усл. ед. а, б — в присутствии 5 и 50 нг/мл пролактина соответственно. Различия между 1 и 2 (а, б) достоверны при  $P < 0.05$ . Здесь и на рис. 2—4 представлены изменения  $Ca^{2+}$ , полученные в 4—5 экспериментах.

3—6 мм и освобождали ооцит-кумулюсные комплексы. Выделение ооцит-кумулюсных комплексов производили в физиологическом растворе. В опытах использовали ооциты округлой формы с тонкогранулированной оплазмой и равномерной по ширине зоной пеллюциды. Выделенные ооциты инкубировали в модифицированной инкубационной среде Дюльбекко, содержащей 36 мг/л пирувата Na, 1 г/л глюкозы и не содержащей  $CaCl_2$ .

О концентрации  $Ca^{2+}$  во внутриклеточных компартментах судили по флуоресценции хлортетрациклина (ХТЦ), которая зависит от количества  $Ca^{2+}$ , связанного с внутриклеточными депо (Engelmann et al., 1990). Перед проведением измерений ооциты очищали от клеток кумулюса и ооциты инкубировали в течение 5 мин при 37 °С в инкубационной среде, содержащей 40 мкМ ХТЦ. После этого клетки 3 раза отмывали в инкубационной среде и переносили на специальное кварцевое стекло с ячейками объемом 0.05 мл. Зависимую от  $Ca^{2+}$  флуоресценцию ХТЦ в ооцитах регистрировали в среде Дюльбекко.

Интенсивность флуоресценции зонда ХТЦ измеряли с помощью флуориметрической установки, состоящей из люминесцентного микроскопа, снабженного ртутной лампой постоянного тока ДРШ-250-3, необходимыми светофильтрами и фотометрической насадкой ФМЭЛ-1А. Комплекс, образующийся между ХТЦ и связанным с внутриклеточными мембранами  $Ca^{2+}$ , возбуждали светом 380—400 нм, флуоресценцию регистрировали в области 530 нм. Интенсивность флуоресценции измеряли в усл. ед. Длительность воздействия ультрафи-

олетового излучения на ооциты при проведении измерений не превышала 5 с.

В работе использовали следующие вещества: инкубационную среду Дюльбекко, ингибитор протеинкиназы С Ro 31-8220, ингибитор  $IP_3$ -рецепторов гепарин и дигитонин (Sigma, США); ингибитор риадиноновых рецепторов рутениевый красный (Merck); GTP и GDP (Reanal, Венгрия); гипофизарный бычий пролактин (20 МЕ/мл; Институт эндокринологии, Москва). В экспериментах применяли реактивы в следующих концентрациях: Ro 31-8220 — 10 нг/мл, гепарин — 0.1—10.0 мг/мл, дигитонин — 4 мкМ, рутениевый красный — 200 мкМ, GTP — 10 мкМ, GDP — 100 мкМ, пролактин — 5 и 50 нг/мл. Время обработки ооцитов составляло 10 мин при 37 °С. Ro 31-8220 растворяли в диметилсульфоксиде, а остальные вещества разводили в среде Дюльбекко.

Достоверность различия сравниваемых средних значений для 4—5 независимых экспериментов оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента.

## Результаты

Результаты влияния ингибитора  $IP_3$ -чувствительных рецепторов гепарина на стимулированное пролактином освобождение  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо ооцитов свиней, выделенных из яичников на стадии желтого тела, показаны на рис. 1. Добавление к ооцитам пролактина в концентрации 5 или 50 нг/мл вызывало освобождение  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо. Обработка ооцитов гепарином и последующее действие на них пролактина в концентрации 5 или 50 нг/мл ингибировали освобождение

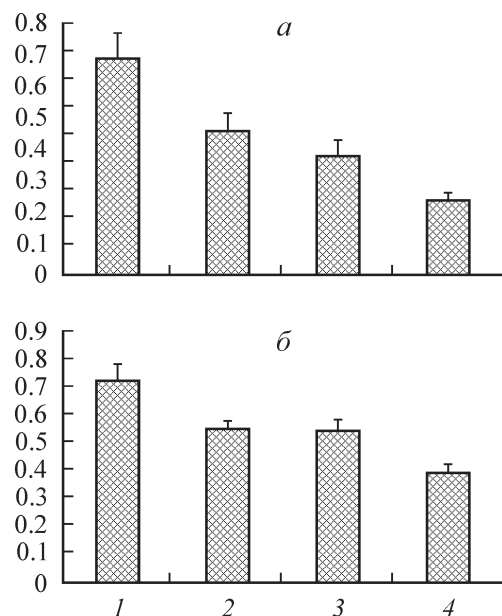


Рис. 2. Влияние ингибитора риадиноновых рецепторов на стимулированное пролактином освобождение  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо ооцитов свиней.

По горизонтали: 1 — контроль (необработанные ооциты), 2 — стимуляция пролактином, 3 — действие ингибитора риадиноновых рецепторов рутениевого красного (РК, 200 мкМ), 4 — действие РК с последующей обработкой пролактином. По вертикали — интенсивность флуоресценции ХТЦ, усл. ед. а, б — в присутствии 5 и 50 нг/мл пролактина соответственно. Различия между 1 и 2 (а, б) и между 3 и 4 (а, б) достоверны при  $P < 0.05$ .

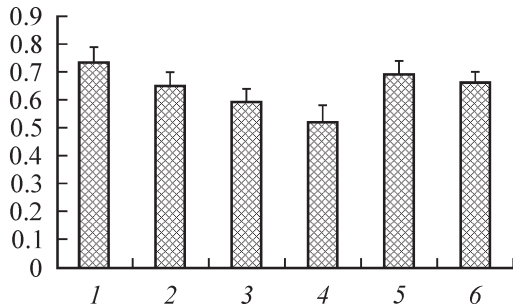


Рис. 3. Влияние ингибиторов рианодиновых и IP<sub>3</sub>-рецепторов на стимулированное GTP (10 мкМ) освобождение Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных депо ооцитов свиней.

По горизонтали: 1 — контроль (необработанные ооциты), 2 — обработка GTP, 3 — действие ингибитора рианодиновых рецепторов рутениевого красного (РК, 200 мкМ), 4 — действие РК с последующей обработкой GTP, 5 — действие 1 мг/мл гепарина, 6 — то же с последующей обработкой GTP. По вертикали — интенсивность флуоресценции ХТЦ, усл. ед.

ние Ca<sup>2+</sup> из депо. Ингибирующий эффект был выражен при всех используемых концентрациях гепарина — от 0.1 до 10.0 мг/мл (рис. 1, а, б).

Данные о влиянии ингибитора рианодиновых рецепторов рутениевого красного на освобождение Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных депо ооцитов свиней при их активации пролактином представлены на рис. 2. При использовании пролактина в концентрации 5 нг/мл (рис. 2, а) предварительное ингибирование рианодиновых рецепторов с помощью рутениевого красного (200 мкМ) не оказывало влияния на освобождение Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных депо ооцитов. Такой же эффект рутениевого красного на освобождение Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных депо был отмечен при действии пролактина в концентрации 50 нг/мл (рис. 2, б).

Влияние GTP на освобождение Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных депо ооцитов представлено на рис. 3. Внесение

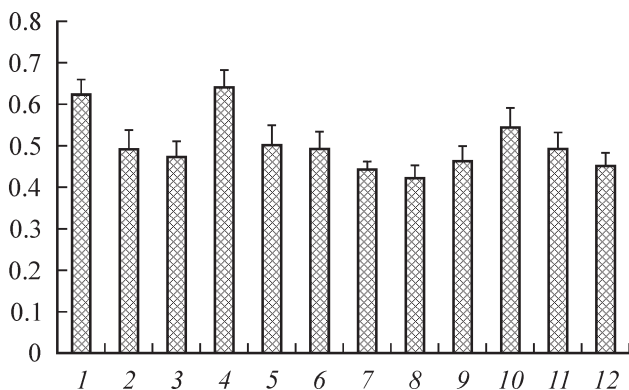


Рис. 4. Влияние ингибитора протеинкиназы С (Ro 31-8220) на стимулированное пролактином и GTP освобождение Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных депо ооцитов свиней.

По горизонтали: 1 — контроль (необработанные ооциты); 2, 3 — активация пролактином в концентрациях 5 и 50 нг/мл соответственно; 4 — 10 мкМ GTP; 5, 6 — совместное действие GTP и пролактина в концентрациях 5 и 50 нг/мл соответственно; 7 — действие 10 нг/мл Ro 31-8220; 8, 9 — то же с последующей обработкой пролактином в концентрациях 5 и 50 нг/мл соответственно; 10 — действие 10 нг/мл Ro 31-8220 с последующей обработкой GTP; 11, 12 — 10 нг/мл Ro 31-8220 и последующее совместное действие GTP и пролактина в концентрациях 5 и 50 нг/мл соответственно. По вертикали — интенсивность флуоресценции ХТЦ, усл. ед. Различия между 1 и 7 достоверны при  $P < 0.001$ , между 1 и 2 и между 1 и 3 при  $P < 0.05$ .

нуклеотида в концентрации 10 мкМ не вызывало освобождения Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных депо. Также не влияли на Ca<sup>2+</sup> внутриклеточных депо обработка ооцитов ингибиторами рутениевого красного или гепарином и последующее воздействие на эти ооциты GTP.

На рис. 4 представлены данные о влиянии ингибитора PKC Ro 31-8220 (10 нг/мл) на стимулированное пролактином и GTP освобождение Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных депо ооцитов свиней. Видно, что пролактин (5 и 50 нг/мл) в отличие от GTP (10 мкМ) стимулирует освобождение Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных депо ооцитов. При совместном действии GTP и пролактина (5 и 50 нг/мл) дополнительного освобождения Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных депо не было. Внесение в среду инкубации с ооцитами соединения Ro 31-8220 приводило к освобождению Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных депо, а последующая активация ооцитов пролактином (5 и 50 нг/мл) или GTP не вызывала дополнительного освобождения Ca<sup>2+</sup>. Не было дополнительного освобождения Ca<sup>2+</sup> и после совместного действия GTP и пролактина на обработанные ингибитором PKC ооциты.

## Обсуждение

Известно, что на стадии желтого тела скорость роста фолликулов свиней замедляется. В них происходит изменение спектра взаимодействующих гормонов и их концентраций, в результате чего активируются процессы атрезии (Guthrie, Garrett, 2001). Как одна из составляющих этого процесса изменяется и [Ca<sup>2+</sup>]<sub>in</sub> (Fortune, 1994). В ооцитах свиней при исследовании внутриклеточных Ca<sup>2+</sup>-освобождающих механизмов было показано, что внутриклеточные депо кальция состоят из двух отдельных пулов — чувствительных и нечувствительных к IP<sub>3</sub> (Machaty et al., 1997). Между этими двумя типами внутриклеточных депо в ооцитах может происходить обмен кальция. Результатом этого обмена является локальное увеличение концентрации внутриклеточного кальция, которое обеспечивает прохождение многих Ca<sup>2+</sup>-зависимых процессов, в том числе и созревание ооцитов, а также реинициацию мейоза (Voronina, Wessel, 2003).

Ранее было показано, что в ооцитах свиньи, выделенных из яичников на стадии фолликулярного роста, при совместном действии экзогенных GTP и пролактина происходит дополнительное освобождение Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных депо (Денисенко, Кузьмина, 2005). GTP и пролактин в ооцитах активируют освобождение Ca<sup>2+</sup> из различных внутриклеточных депо: GTP — из рианодин-чувствительного, пролактин — из IP<sub>3</sub>-чувствительного. Кроме того, предполагается, что GTP может модифицировать внутриклеточное депо с помощью цитоскелета, обеспечивая таким образом перемещение Ca<sup>2+</sup> между IP<sub>3</sub>-чувствительными и IP<sub>3</sub>-нечувствительными депо (Hajnóczky et al., 1994).

Дополнительное освобождение Ca<sup>2+</sup> из депо при совместном действии GTP и пролактина происходит только в присутствии активной PKC. И хотя PKC активируется пролактином в обеих используемых концентрациях, только при совместном действии GTP и пролактина в концентрации 50 нг/мл возникает дополнительный выход Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных депо. По-видимому, концентрационная разница в действии пролактина связана с активацией различных рецепторов внутри клетки. Проллактин в концентрации 5 нг/мл активирует IP<sub>3</sub>-чувстви-



тельные рецепторы, в то время как пролактин в концентрации 50 нг/мл — еще и IP<sub>3</sub>-нечувствительные (Денисенко, Кузьмина, 2005). Похожее действие отмечено и на других объектах, в которых РКС ингибировала освобождение Ca<sup>2+</sup> из депо, вызванное стимуляцией IP<sub>3</sub>-рецепторов (Bird et al., 1993; Sipma et al., 1996).

Таким образом, для осуществления возможного взаимодействия между внутриклеточными депо и перемещения Ca<sup>2+</sup> между ними требуются определенные условия. Одними из них являются активация обоих типов внутриклеточных депо, а также способность одного из действующих веществ активировать РКС без ингибирующего влияния последней на выход из депо Ca<sup>2+</sup>.

Во время лютеальной фазы у свиней фолликулярное развитие ингибируется и фолликулы не развиваются до размера больше 5—6 мм в диаметре, хотя фолликулярная волна, стимулирующая развитие фолликулов, присутствует и в это время (Mariscal et al., 1998). Ингибирование роста фолликулов может быть опосредовано различными факторами, одним из которых является снижение [Ca<sup>2+</sup>]<sub>in</sub> (Magnelli et al., 1994; Jayadev et al., 1999). Причиной снижения [Ca<sup>2+</sup>]<sub>in</sub> может являться уменьшение его выхода из внутриклеточных депо. При совместном действии GTP и пролактина в ооцитах, выделенных из яичников на стадии желтого тела, не отмечали дополнительного освобождения Ca<sup>2+</sup> из депо. В ооцитах на этой стадии пролактин активирует РКС и, кроме этого, IP<sub>3</sub>-чувствительные рецепторы. Как уже говорилось, РКС ингибирует освобождение Ca<sup>2+</sup>, вызванное стимуляцией IP<sub>3</sub>-чувствительных рецепторов. Это может быть одной из причин, ограничивающих выход Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных депо ооцитов. Другой возможной причиной может быть отсутствие влияния GTP на освобождение Ca<sup>2+</sup>. В ооцитах, выделенных из яичников на стадии фолликулярного роста, GTP вызывает освобождение Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных депо и, как предполагается, способствует обмену Ca<sup>2+</sup> между депо. Все это, по-видимому, может приводить к изменению концентрации Ca<sup>2+</sup> во внутриклеточных депо и соответственно [Ca<sup>2+</sup>]<sub>in</sub> и являться одной из причин, вызывающих торможение роста фолликулов в яичниках на стадии желтого тела.

### Список литературы

- Денисенко В. Ю., Кузьмина Т. И. 2005. Эффект гуаниновых нуклеотидов и протеинкиназы С на стимулированное пролактином освобождение Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных депо ооцитов свиней. *Онтогенез*. 36 (3) : 1—6.
- Banerjee R., Vonderhaar B. K. 1992. Prolactin-induced protein kinase C activity in mouse mammary cell line (NOG-8). *Mol. Cell. Endocrinol.* 90 : 61—67.
- Berridge M. J. 2002. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium*. 32 : 235—249.
- Bird G. S., Rossier M. F., Obie J. F., Putney J. W., Jr. 1993. Sinusoidal oscillations in intracellular calcium requiring negative feedback by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 268 : 8425—8428.
- Clapham D. E. 1995. Calcium signaling. *Cell*. 80 : 259—268.
- Dawson A. P., Comerford J. G., Fulton D. V. 1986. The effect of GTP on inositol 1,4,5-trisphosphate-stimulated Ca<sup>2+</sup> efflux from a rat liver microsomal fraction. Is a GTP-dependent protein phosphorylation involved? *Biochem. J.* 234 : 311—315.
- Engelmann B., Schumacher U., Duhr J. 1990. Use of chlortetracycline fluorescence for the detection of Ca<sup>2+</sup> storing intracellular vesicles in normal human erythrocytes. *J. Cell. Physiol.* 143 : 357—363.
- Fortune G. E. 1994. Ovarium follicular growth and development in mammals. *Biol. Reprod.* 50 : 225—232.
- Gertler A., Friesen H. G. 1986. Human growth hormone-stimulated mitogenesis of Nb2 node lymphoma cells is not mediated by an immediate acceleration of phosphoinositide metabolism. *Mol. Cell. Endocrinol.* 48 : 221—228.
- Ghosh T. K., Eis P. S., Mullaney J. M., Ebert C. L., Gill D. I. 1988. Competitive, reversible, and potent antagonism of inositol 1,4,5-trisphosphate-activated calcium release by heparin. *J. Biol. Chem.* 263 : 11 075—11 079.
- Gill D. L., Ueda T., Chueh S. H., Noel M. W. 1986. Ca<sup>2+</sup> release from endoplasmic reticulum is mediated by a guanine nucleotide mechanism. *Nature*. 320 : 461—464.
- Guthrie H. D., Garrett W. M. 2001. Apoptosis during folliculogenesis in pig. *Reprod. Suppl.* 58 : 17—29.
- Hajnoczky G., Lin A., Thomas A. 1994. Luminal communication between intracellular calcium stores modulated by GTP and the cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 269 : 10 280—10 287.
- Henne V., Soling H. D. 1986. Guanosine-5-trisphosphate release calcium from rat liver and guinea pig parotid gland endoplasmic reticulum independently of inositol 1,4,5-trisphosphate. *FEBS Lett.* 202 : 267—273.
- Jayadev S., Petranka J. G., Cheran S. K., Biermann J. A., Barrett J. C., Murphy E. 1999. Reduced capacitance calcium entry correlates with vesicle accumulation and apoptosis. *J. Biol. Chem.* 274 : 8261—8268.
- Machaty Z., Funahashi H., Day B. N., Prather R. S. 1997. Developmental changes in the intracellular Ca<sup>2+</sup> release mechanisms in porcine oocytes. *Biol. Reprod.* 56 : 921—930.
- Magnelli L., Cinelli M., Turchetti A., Chiarugi V. P. 1994. Bcl-2 overexpression abolishes early calcium waving preceding apoptosis in NIH-3T3 murine fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204 : 84—90.
- Mariscal D. V., Bergfeld E. G., Cupp S. A., Kojima K. E., Fike T., Sanchez M. E., Wehrman R. K., Johnson R. K., Kittok R. J., Ford J. J., Kinder J. E. 1998. Concentrations of gonadotropins, estradiol and progesterone in sows selected on an index of ovulation rate and embryo survival. *Anim. Reprod. Sci.* 54 : 1—43.
- Mullaney J. M., Chueh S. H., Ghosh T. K., Zachary A. L., Gill D. L. 1987. Intracellular calcium uptake activated by GTP. Evidence for a possible guanine nucleotide-induced transmembrane conveyance of intracellular calcium. *J. Biol. Chem.* 262 : 13 865—13 872.
- Ratovondrahona D., Fournier B., Odessa M. F., Dufy B. 1998. Prolactin stimulation of phosphoinositide metabolism in CHO cells stably expressing the PRL receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243 : 127—130.
- Sipma H., van der Zee L., van den Akker J., den Hertog A., Nelenmans A. 1996. The effect of the PKC inhibitor GF109203X on the release of Ca<sup>2+</sup> from internal stores and Ca<sup>2+</sup> entry in DDT1 MF-2 cells. *Br. J. Pharm.* 119 : 730—736.
- Thomas A. P., Bird G. S., Hajnoczky G., Robb-Gaspers L. D., Putney J. W., Jr. 1996. Spatial and temporal aspects of cellular calcium signaling. *FASEB J.* 10 : 1505—1517.
- Thomas A. P. 1988. Potentiation by GTP of Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> mobilization in permeabilized hepatocytes. *Exp. Med. Biol.* 232 : 197—201.
- Voronina E., Wessel G. M. 2003. The regulation of oocyte maturation. *Curr. Top. Develop. Biol.* 58 : 53—110.
- Yue C., White K. L., Reed W. A., Bunch T. D. 1995. The existence of inositol 1,4,5-trisphosphate and ryanodine receptors in mature bovine oocytes. *Development*. 121 : 2645—2654.

INFLUENCE OF RYANODINE AND INOSITOL TRISPHOSPHATE RECEPTORS  
INHIBITIONS ON Ca<sup>2+</sup> EXIT FROM INTRACELLULAR STORES  
OF PORCINE OOCYTES STIMULATED BY PROLACTIN AND GTP

*V. Yu. Denisenko, T. I. Kuzmina<sup>1</sup>*

All-Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding, St. Petersburg—Pushkin; <sup>1</sup> e-mail: tkuzmina@rol.ru

The influence of ryanodine and inositol triphosphate receptors inhibitors on Ca<sup>2+</sup> exit from intracellular stores of porcine oocytes stimulated by prolactin and GTP was investigated using fluorescent dye chlortetracycline. Porcine oocytes were isolated from ovaries with yellow body. Ca<sup>2+</sup> exit from intracellular stores of porcine oocytes activated by prolactin (5 and 50 ng/ml) in calcium free medium was decreased after treatment of oocytes by heparin (inhibitor of inositol triphosphate receptors) and was not changed after treatment of oocytes by ruthenium red (inhibitor of ryanodine receptors). Inhibition of protein kinase C did not affect on the Ca<sup>2+</sup> exit stimulated by prolactin. GTP did not stimulate Ca<sup>2+</sup> exit from intracellular stores of pig oocytes, and inhibitors of both calcium channels and proteinkinase C had no influence on this process. The joint action of prolactin and GTP did not result in additional Ca<sup>2+</sup> exit from intracellular stores of oocytes after both pretreatment and untreated by the inhibitor of protein kinase C. The data obtained testify to activation of IP<sub>3</sub>-sensitive receptors under effect of prolactin and in the absence of GTP influence on these receptors.

Key words: prolactin, GTP, calcium, pig oocytes.

---