

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СИГНАЛЬНЫХ КАСКАДОВ, ИНДУЦИРОВАННЫХ цАМФ И ПРОЛАКТИНОМ В ООЦИТ-КУМУЛЮСНЫХ КОМПЛЕКСАХ КОРОВ

© И. Ю. Лебедева,^{1,2,*} Г. Н. Сингина,¹ Н. А. Волкова,¹ А. Н. Мормышев,¹
А. К. Голубев,² Н. А. Зиновьева¹

¹ Всероссийский государственный научно-исследовательский институт животноводства РАСХН, Подольск,
и ² Кафедра генетики, разведения и биотехнологии животных

С.-Петербургского государственного аграрного университета, Санкт-Петербург—Пушкин;

* электронный адрес: irledv@mail.ru

Пролактин (ПРЛ) является одним из гипофизарных гормонов, участвующих в контроле фолликуло- и оогенеза у млекопитающих. В представленной работе было исследовано *in vitro* совместное влияние ПРЛ (50 нг/мл) и дибутирильного производного цАМФ (дбцАМФ, 1 мМ) на созревание ооцитов и морфофункциональное состояние окружающих их кумулюсных клеток. Показано, что ПРЛ полностью подавляет тормозящее влияние дбцАМФ на реинициацию мейоза и завершение ядерного созревания ооцитов. Кроме того, ПРЛ частично ингибировал экспансию кумулюса, индуцированную дбцАМФ, хотя в контрольной среде он вызывал противоположный эффект. В присутствии ПРЛ было обнаружено ингибирующее влияние дбцАМФ на пролиферативную активность клеток кумулюса и на вызванное ПРЛ торможение деструктивных процессов в этих клетках. В кумулюсных клетках методом ОТ-ПЦР была выявлена экспрессия мРНК длинной изоформы рецептора ПРЛ. Полученные данные свидетельствуют о взаимодействии сигнальных каскадов, индуцированных ПРЛ и цАМФ в ооцит-кумулюсных комплексах коров, причем участок сопряжения этих каскадов в ооцитах, по-видимому, отличается от такового в клетках кумулюса.

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

Принятые сокращения: дбцАМФ — дибутирильное производное цАМФ, Дп — диплотена, МП — метафаза II, ОКК — ооцит-кумулюсные комплексы, ОТ-ПЦР — обратная транскрипция, совместная с полимеразной цепной реакцией, ПРЛ — пролактин, Т1 — телофаза I.

Циклический АМФ (цАМФ) является одним из ключевых регуляторов созревания ооцитов млекопитающих, а также вторичным посредником в механизме передачи сигналов гонадотропных гормонов в фолликулярные клетки (Mattioli, 1994; Conti et al., 2002). В соответствии с общепринятой гипотезой, повышение концентрации цАМФ в клетках кумулюса, вызванное стимулирующим мейоз сигналом этих гормонов, приводит к ее снижению в ооцитах (Conti et al., 2002). С этой гипотезой согласуются данные о том, что высокая концентрация цАМФ в ооцитах млекопитающих обуславливает ингибирование реинициации мейоза (Sirard, 2001). Сигнальный каскад, индуцированный цАМФ в ооцитах, включает активацию протеинкиназы А и в конечном итоге приводит к фосфорилированию и инактивации комплекса циклинзависимая киназа/циклин В, который также называют фактором промоции созревания (Mehlmann, 2005). Изменение концентрации этого циклического нуклеотида в ооцитах и окружающих их клетках кумулюса связано не только с инициацией созревания, но и с его завершением (Shimada, Terada, 2002; Luciano et al., 2004). Кроме того, цАМФ стимулирует экспансию кумулюсных клеток, сопутствующую созреванию ооцитов (Vanderhyden, 1993; Schuetz et al., 1996).

Пролактин (ПРЛ) является одним из гипофизарных гормонов, участвующих в контроле фолликуло- и оогенеза у млекопитающих, что подтверждается наличием лактогенных рецепторов или их мРНК в фолликулярных клетках разного типа (Лебедева и др., 2001; Vlahos et al., 2001; Picazo et al., 2004). Функционирование внутриклеточной системы проведения сигнала ПРЛ в овариальные клетки необходимо для поддержания нормальной фертильности самок (Bole-Feysot et al., 1998; Bartke, 1999). Одна из функций ПРЛ заключается в модуляции регуляторного влияния гонадотропных гормонов на секреторную активность фолликулярных клеток, причем механизм этого модулирующего влияния, по-видимому, связан с изменением синтеза или деградации цАМФ (Demura et al., 1986; Gitay-Goren et al., 1989; Krasnow et al., 1990). Как известно, действие ПРЛ на клетки-мишени не опосредуется цАМФ-зависимым механизмом (Goffin et al., 2002). Поэтому модулирующее влияние ПРЛ может быть следствием сопряжения сигнальных каскадов, индуцированных ПРЛ и цАМФ в фолликулярных клетках.

На модели культивирования *in vitro* было показано, что ПРЛ тормозит ингибирующее влияние теофиллина — неселективного ингибитора цАМФ-фосфодиэстераз — на

созревание ооцит-кумулясных комплексов (ОКК) коров (Лебедева и др., 2006). Тем не менее полученные данные не исключали возможности супрессирующего влияния ПРЛ на синтез цАМФ в клетках. Поэтому в представленной работе было исследовано *in vitro* совместное влияние ПРЛ и дибутирильного производного цАМФ (дбцАМФ), эффективно проникающего в клетки, на реинициацию мейоза и завершение ядерного созревания ооцитов, а также на морфофункциональное состояние окружающих их кумулюсных клеток. Кроме того, в клетках кумулюса была проанализирована экспрессия мРНК длинной изоформы рецептора ПРЛ, ответственной за проведение его сигнала в клетки-мишени (Jabbour, Kelly, 1997).

Материал и методика

Объектом исследования служили ОКК из антральных фолликулов яичников коров и половозрелых телок. Полученные на мясокомбинате яичники без видимых признаков патологии 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 мг/мл стрептомицина).

Для выделения и культивирования клеток использовали среду TC-199 (с L-глутамином и NEPEs), фетальную бычью сыворотку, дбцАМФ, коллагеназу II, гентамицин, лактат кальция и пируват натрия (все — Sigma, США); минеральное масло (ICN, США); препарат гипофизарного бычьего ПРЛ (Институт эндокринологии РАМН, Москва). Реактивы для анализа экспрессии мРНК: EverFresh (Clonogene, Россия); TRI Reagent (Sigma, США); хлороформ и изопропанол (Химмед, Россия); набор RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Литва); Taq-полимераза и dNTP (Сибэнзим, Россия); олигонуклеотиды (Синтол, Россия).

Выделение, оценку и культивирование ОКК выполняли, как описано ранее (Лебедева и др., 2006). Время инкубации ОКК составляло 6 и 24 ч. В качестве контроля использовали среду TC-199, содержащую 10 % фетальной бычьей сыворотки, 0,55 мг/мл лактата кальция, 0,23 мг/мл пирувата натрия и 50 мг/мл гентамицина. В опытных группах в среду вносили дбцАМФ (1 мМ), ПРЛ (50 нг/мл) или одновременно дбцАМФ и ПРЛ. В конце 24-часового периода культивирования ОКК оценивали морфологически на основании известных критериев 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. Все манипуляции с ОКК, а также их морфологическую оценку выполняли с помощью стереомикроскопа Nikon.

Подготовку и оценку препаратов хромосом ооцитов проводили, как описано ранее (Лебедева и др., 2005). Клетки кумулюса из ОКК, культивированных в течение 24 ч, фиксировали смесью метанола и уксусной кислоты (3 : 1) и окрашивали азуром—эозином. Наличие деструктивных изменений в клетках оценивали на основании морфологических критериев, разработанных ранее для клеток гранулезы, подвергающихся апоптозу (Jolly et al., 1997). Признаками дегенерации ядерного материала слу-

жили: 1) компактное ядро с гомогенно окрашенным, слипшимся хроматином (пикноз); 2) образование нескольких фрагментов слипшегося хроматина; 3) слипание части хроматина в темноокрашенную массу, локализованную вдоль ядерной мембраны. Кроме того, были идентифицированы кумулюсные клетки с морфологическими признаками, характерными для митоза (от стадии профазы до телофазы). На каждом препарате было оценено не менее 1000 клеток. Долю клеток с признаками дегенерации ядерного материала или митотических клеток выражали в процентах от общего числа клеток кумулюса. Исследование состояния ядерного материала в ооцитах и клетках кумулюса проводили с помощью микроскопа Ortop (ФРГ) при увеличении 1000×.

Эксперименты по культивированию ОКК были выполнены в 4 независимых повторностях. Данные обрабатывали методом двухфакторного дисперсионного анализа при помощи программы SigmaStat. Достоверность различия сравниваемых средних значений оценивали с использованием критерия Тьюки (Лакин, 1990), при этом был принят уровень значимости $P < 0.05$.

Для анализа экспрессии мРНК длинной изоформы рецептора ПРЛ использовали клетки кумулюса и гранулезы из фолликулов диаметром 3—5 мм, а также ткань развитого желтого тела. Диссоциацию клеток кумулюса из свежeweделенных ОКК проводили обработкой коллагеназой II (1 мг/мл) в течение 25 мин при 37 °С. Клетки гранулезы выделяли, как было описано ранее (Лебедева и др., 2005), удалив предварительно ОКК из фолликулярной жидкости. После 3-кратного промывания в фосфатном буферном растворе клетки помещали в раствор EverFresh для стабилизации РНК и хранили при –20 °С. Ткань желтого тела замораживали в жидком азоте и хранили при –70 °С. Тотальную РНК выделяли из $1 \cdot 10^6$ — $2 \cdot 10^6$ клеток или 50 мг ткани с использованием реактива TRI Reagent в соответствии с приложенной инструкцией.

Анализ экспрессии мРНК осуществляли методом обратной транскрипции, совмещенной с полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР). Процедуру синтеза первой цепи кДНК выполняли с помощью набора RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit согласно инструкции фирмы-производителя при использовании случайных 6-мерных праймеров (0,2 мкг на пробу). ПЦР проводили в инкубационной смеси (15 мкл), содержащей 1× буфер для Taq-полимеразы, 200 мкМ dNTP, 1 ед. акт. Taq-полимеразы, 1,5 мМ MgCl₂ и 2 мкл смеси реакции ОТ. В пробы добавляли по 5 пМ прямого и обратного праймеров для амплификации кДНК длинной изоформы рецептора ПРЛ или β-актина быка. Последовательность использованных олигонуклеотидов для рецептора ПРЛ (ПЦР-продукт 347 н. п., Ас. NM001039726): прямой праймер — 5'-CAAGCCAGACCATTGGATACT-3', обратный праймер — 5'-GCTGGTCTCAGATCATCT-3'. Амплификацию проводили в следующем режиме: 95 °С 30 с, 54 °С 30 с, 72 °С 90 с, 40 циклов. Последовательность олигонуклеотидов для β-актина (ПЦР-продукт 650 н. п.; Degen et al., 1983): прямой праймер — 5'-GGGTCAACCCACACGGTGGCCATCT-3', обратный праймер — 5'-GAAGCATTTGCGGTGGACAATGGAGG-3'. Были использованы следующие условия амплификации: 95 °С 30 с, 60 °С 30 с, 72 °С 90 с, 40 циклов. Продукты ПЦР подвергали электрофорезу в 2%-ном агарозном геле.

Результаты

При проведении исследований мы использовали бычий ПРЛ в концентрации 50 нг/мл, в которой он оказывает стимулирующее влияние на созревание ОКК коров (Кузьмина и др., 2001). Кроме того, в предварительных экспериментах была определена минимальная концентрация дбцАМФ (1 мМ), при которой достигалось достоверное ингибирование завершения ядерного созревания ооцитов: 40.0 % ооцитов, достигших стадий телофазы I (ТI) или метафазы II (МII), против 60.9 % в контроле ($P < 0.05$).

Дисперсионный анализ данных выявил зависимость реинициации мейоза в ооцитах от наличия дбцАМФ и ПРЛ в среде созревания ($P < 0.05$), а также от взаимодействия этих факторов ($P < 0.01$). Через 6 ч культивирования ОКК в присутствии дбцАМФ доля ооцитов, находящихся на стадии диплофазы (Дп), была значительно выше ($P < 0.01$), чем в контрольной группе (рис. 1, А). ПРЛ не влиял на способность клеток возобновлять мейоз в контрольной среде, тогда как его добавление в среду с дбцАМФ приводило к уменьшению относительного числа ооцитов на стадии Дп ($P < 0.01$).

Присутствие ПРЛ и дбцАМФ в культуральной среде также влияло на завершение ядерного созревания ооцитов ($P < 0.01$). При культивировании ОКК в течение 24 ч в среде, содержащей циклический нуклеотид, было обнаружено уменьшение ($P < 0.01$) доли ооцитов, достигших стадии ТI или МII, по сравнению с контрольной группой (рис. 1, Б). ПРЛ повышал выход созревших кле-

ток как в отсутствие ($P < 0.05$), так и в присутствии дбцАМФ ($P < 0.01$), однако в последнем случае гормональный эффект был более значительным.

Экспансия кумулюса, сопутствующая ядерному созреванию ооцитов, зависела от наличия дбцАМФ в среде культивирования ($P < 0.001$) и его взаимодействия с ПРЛ ($P < 0.01$). При внесении дбцАМФ в контрольную среду повышалась ($P < 0.001$) доля ОКК с высокой (III) степенью разрыхления кумулюса и понижалась ($P < 0.001$) доля ОКК со средней (II) степенью разрыхления (рис. 2, 3). В присутствии одного ПРЛ также наблюдалось увеличение относительного числа ОКК с высокой степенью кумулюсной экспансии ($P < 0.05$), хотя оно было значительно ниже, чем в группе с дбцАМФ ($P < 0.001$). Напротив, гормон снижал долю ОКК с высокой степенью разрыхления кумулюса ($P < 0.01$) и повышал долю ОКК со средней степенью разрыхления ($P < 0.01$) в среде, содержащей дбцАМФ. Тем не менее в этих условиях выход ОКК с высокой и средней степенью экспансии кумулюса не достигал такового в контрольной группе ($P < 0.01$).

Оба исследуемых фактора влияли на пролиферативную активность кумулюсных клеток ($P < 0.001$). При культивировании ОКК дбцАМФ уменьшал ($P < 0.01$) долю митотических клеток как в контрольной среде, так и в среде с пролактином (рис. 4; 5, А). Также было выявлено ростстимулирующее действие пролактина на клетки кумулюса ($P < 0.001$), которое в свою очередь не зависело от присутствия дбцАМФ.

При использовании метода дисперсионного анализа была обнаружена зависимость степени дегенерации кумулюса от наличия ПРЛ в среде культивирования ($P < 0.001$) и взаимодействия гормона с дбцАМФ ($P < 0.01$). Внесение ПРЛ в контрольную среду приводило к снижению ($P < 0.001$) доли кумулюсных клеток с признаками дегенерации ядерного материала (рис. 4; 5, Б). Хотя один дбцАМФ не влиял на деструктивные процессы в клетках кумулюса, он ингибировал тормозящий эффект ПРЛ, повышая относительное число клеток с дегенеративными изменениями ($P < 0.01$).

Дополнительно нами был проведен анализ экспрессии мРНК длинной изоформы рецептора ПРЛ в клетках кумулюса. В качестве положительного контроля были взяты клетки гранулезы, содержащие рецепторы ПРЛ и отвечающие на его митогенное влияние (Лебедева и др., 1995, 2001), а также желтое тело, в котором показана экспрессия мРНК длинной и короткой форм этого рецептора (Schuler et al., 1997). При использовании праймеров для длинной изоформы рецептора ПРЛ на матрице тотальной РНК во всех случаях были получены амплифицированные фрагменты размером около 347 н. п., что соответствовало ожидаемому значению (рис. 6).

Обсуждение

Ингибирующее влияние дбцАМФ на реинициацию и завершение ядерного созревания ооцитов коров, наблюдаемое в настоящей работе, согласуется с данными других авторов (Sirard, First, 1988). Также нами было обнаружено, что ПРЛ подавляет тормозящее влияние дбцАМФ на мейоз ооцитов. Рядом исследователей было показано, что в присутствии стимуляторов синтеза или ингибиторов деградации цАМФ его концентрация в ОКК и ооцитах коров повышается в несколько раз (Bilodeau-Goeseels, 2003; Luciano et al., 2004). Поскольку нами был использован

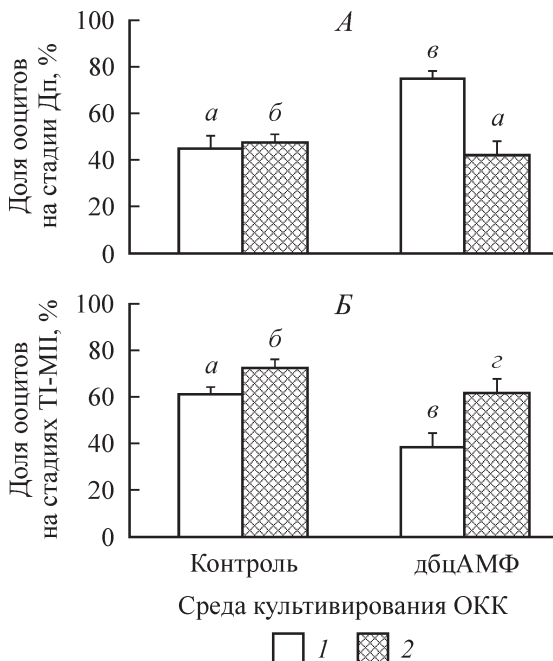


Рис. 1. Влияние ПРЛ на реинициацию мейоза (А) и завершение ядерного созревания ооцитов (Б) при культивировании ОКК коров в отсутствие и в присутствии 1 мМ дбцАМФ.

1 — без добавления ПРЛ, 2 — в присутствии 50 нг/мл ПРЛ. Каждый столбик — среднее для 4 экспериментов. Вертикальные отрезки — стандартные ошибки средних значений. Буквы над столбиками показывают достоверные различия между сравниваемыми средними значениями: а, в $P < 0.01$, б, з $P < 0.05$ (А); а, б $P < 0.05$, а, в $P < 0.01$, б, з $P < 0.001$, в, з $P < 0.01$ (Б). Время культивирования ОКК — 6 (А) и 24 (Б) ч.

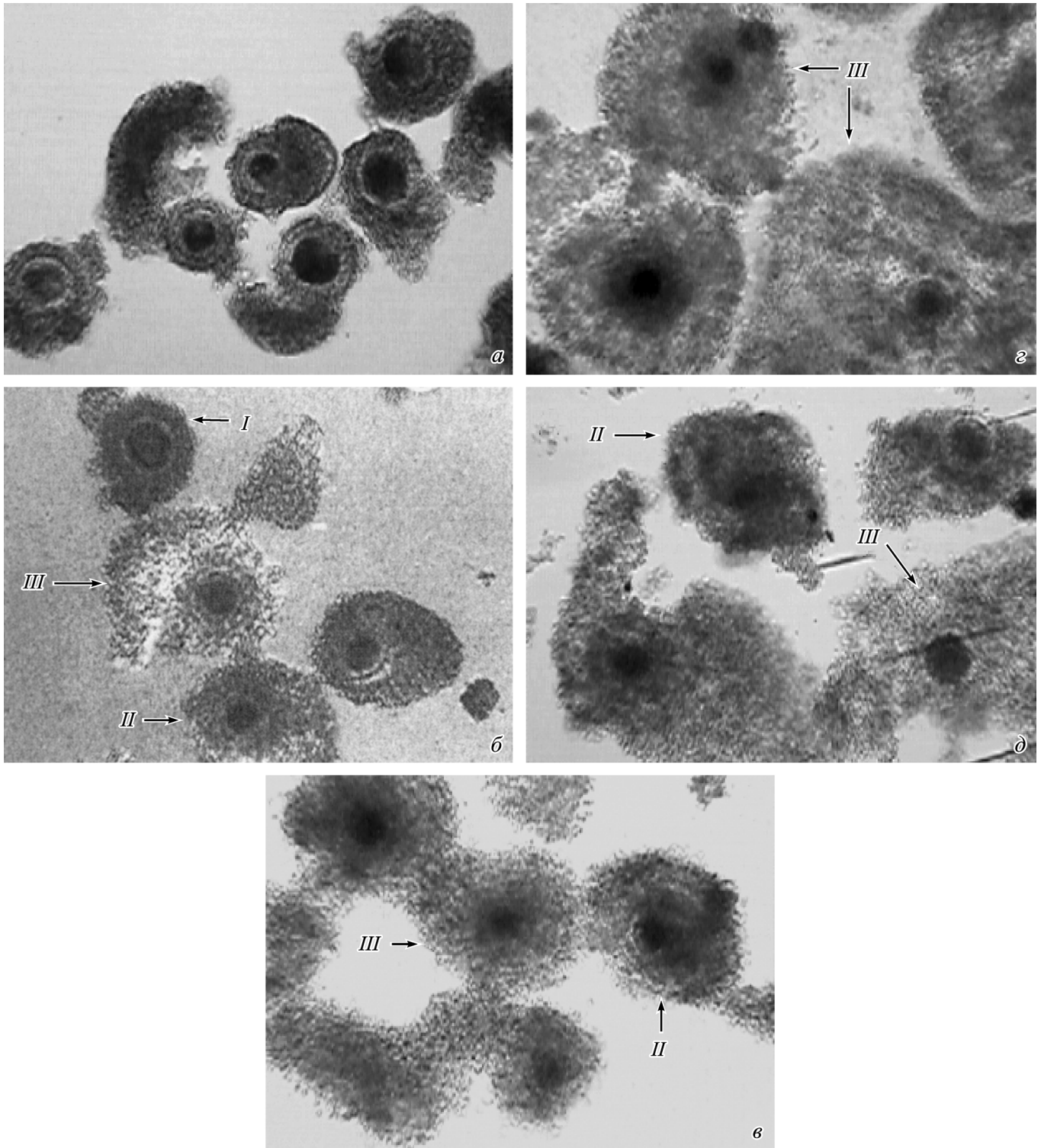


Рис. 2. Репрезентативные микрофотографии состояния кумулюса в ОКК коров до и после культивирования в различных системах в течение 24 ч.

a — свежewedенные ОКК; *б* — ОКК спустя 24 ч культивирования, контроль; *в* — в присутствии 50 нг/мл ПРЛ; *г* — в присутствии 1 мМ дбцАМФ; *д* — в присутствии 50 нг/мл ПРЛ + 1 мМ дбцАМФ. Степень экспансии кумулюса: низкая (*I*), средняя (*II*) и высокая (*III*). Об. 10×, ок. 10×.

1 мМ дбцАМФ, который эффективно проникает в клетки, то, следовательно, роль эндогенного цАМФ в торможении мейоза была незначительна. Это позволяет сделать вывод о том, что выявленное супрессирующее влияние ПРЛ на цАМФ-индуцированные эффекты не было связа-

но с ингибированием внутриклеточного синтеза циклического нуклеотида. Таким образом, это влияние могло быть следствием гормональной стимуляции деградации дбцАМФ в ооцитах. В пользу этой гипотезы свидетельствуют данные об ингибирующем влиянии ПРЛ на тормозя-

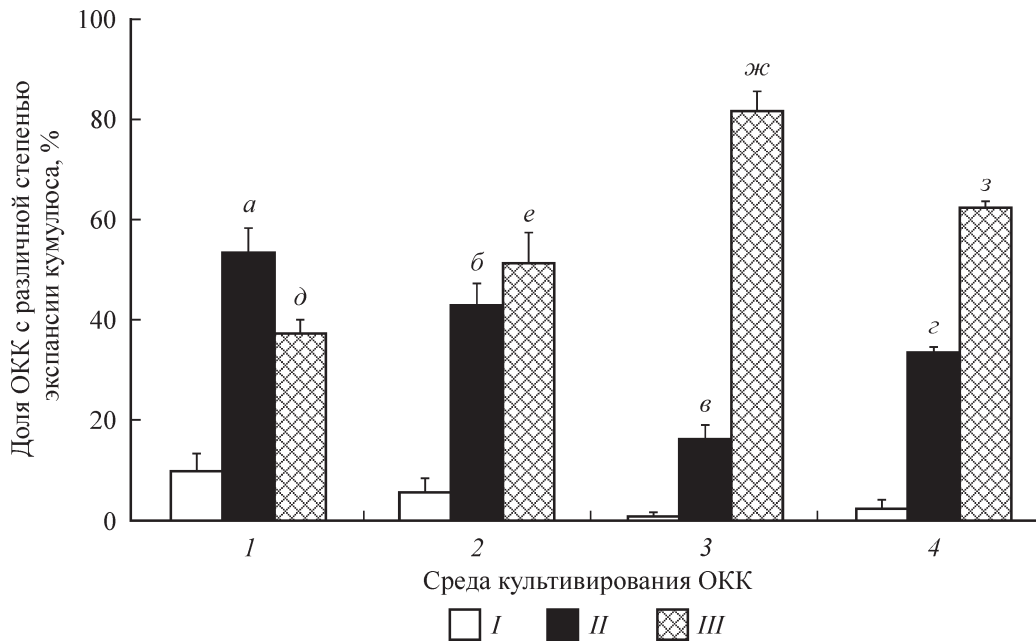


Рис. 3. Влияние ПРЛ на экспансию кумулюса при культивировании ОКК коров в отсутствие и в присутствии 1 мМ дбцАМФ.

1 — контроль, 2 — в присутствии 50 нг/мл ПРЛ, 3 — в присутствии 1 мМ дбцАМФ, 4 — в присутствии 50 нг/мл ПРЛ + 1 мМ дбцАМФ. Время культивирования ОКК 24 ч. Достоверные различия между сравниваемыми средними значениями: $a, б P < 0.05$, $a, в P < 0.001$, $a, з P < 0.01$, $б, в P < 0.001$, $в, з P < 0.01$, $д, е P < 0.05$, $д, ж P < 0.001$, $д, з P < 0.01$, $е, ж P < 0.001$, $ж, з P < 0.01$. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1, 2.

шее мейоз действие теofilлина — неселективного ингибитора цАМФ-фосфодиэстераз (Лебедева и др., 2006). Тем не менее нельзя полностью исключить возможность ингибирования пролактином цАМФ-зависимого сигнального каскада уже после его индукции в ооцитах, например путем инактивации протеинкиназы А.

К настоящему времени установлено, что в регуляции мейоза участвует фосфодиэстераза 3, идентифицированная в ооцитах разных видов млекопитающих, включая коров (Conti et al., 2002; Mayes, Sirard, 2002). В незрелых ооцитах она находится в неактивном состоянии, что обеспечивает поддержание высокого внутриклеточного уровня цАМФ. В наших экспериментах ПРЛ не влиял на реинициацию мейоза, но подавлял тормозящее мейоз действие дбцАМФ. Таким образом, реиницирующий мейоз эффект гормона может быть реализован только при повышении внутриклеточной концентрации этого циклического нуклеотида. При использовании теofilлина, понижающего деградацию эндогенного цАМФ, ранее были получены сходные данные, позволившие предположить участие ПРЛ в активации фосфодиэстеразы 3 в ооцитах (Лебедева и др., 2006). Следовательно, повышение внутриклеточной концентрации цАМФ может являться необходимым звеном в цепи сигнального каскада, индуцируемого ПРЛ, который вызывает активацию фосфодиэстеразы 3 и в конечном итоге приводит к возобновлению мейоза.

Нами также было установлено, что ПРЛ стимулирует завершение ядерного созревания ооцитов не только в присутствии, но и в отсутствие дбцАМФ, как уже было показано ранее (Кузьмина и др., 2001), однако в первом случае степень гормонального воздействия была значительно выше. Вероятно, это было следствием аддитивности двух разных эффектов гормона: стимуляция созревания, которая наблюдалась в контрольной среде, и ингибирования тормозящего мейоз действия дбцАМФ. Поэтому можно предположить, что стимулирующее влияние ПРЛ

на завершение ядерного созревания ооцитов в контрольной среде не связано с модуляцией цАМФ-зависимого сигнального каскада. Аддитивность разных эффектов гормона указывает на относительную независимость механизмов их реализации и, следовательно, на возможность функционирования различных путей проведения его сигнала в ооцитах. Согласно общепринятым представлениям, клетки кумулюса опосредуют сигнал, получаемый от ПРЛ, преобразуя и посылая его в ооцит через сеть щелевых контактов. У коров ранее было показано наличие рецепторов ПРЛ в смешанных образцах клеток гранулезы и кумулюса (Лебедева и др., 2001). В представленной работе нами была выявлена экспрессия мРНК длинной изоформы рецептора ПРЛ, участвующей в проведении его сигнала в клетки-мишени (Jabbour, Kelly, 1997), как в клетках гранулезы, так и в клетках кумулюса. Кроме того, возможен и прямой путь воздействия ПРЛ на ооциты, поскольку недавно было показано наличие его рецепторов в ооцитах овец (Picazo et al., 2004), а также экспрессия их мРНК в ооцитах мышей (Kiarakou et al., 2005). Однако независимо от того, является ли влияние гормона на половые клетки прямым или опосредованным клетками кумулюса, оно, очевидно, реализуется путем активации в ооцитах сигнального каскада, который пересекается с цАМФ-зависимым путем. В пользу этого вывода свидетельствуют данные о том, что в ооцитах и клетках кумулюса локализованы фосфодиэстеразы разного типа (фосфодиэстеразы 3 и 4 соответственно), причем ингибирование активности фосфодиэстеразы 4 в клетках кумулюса не вызывает торможения мейоза в ооцитах (Mayes, Sirard, 2002). Таким образом, взаимодействие цАМФ и ПРЛ-индуцируемых сигнальных каскадов, приводящее к снятию блокады мейоза, по-видимому, происходит непосредственно в ооцитах.

Созревание ооцита у млекопитающих сопровождается экспансией клеток кумулюса, которую индуцируют

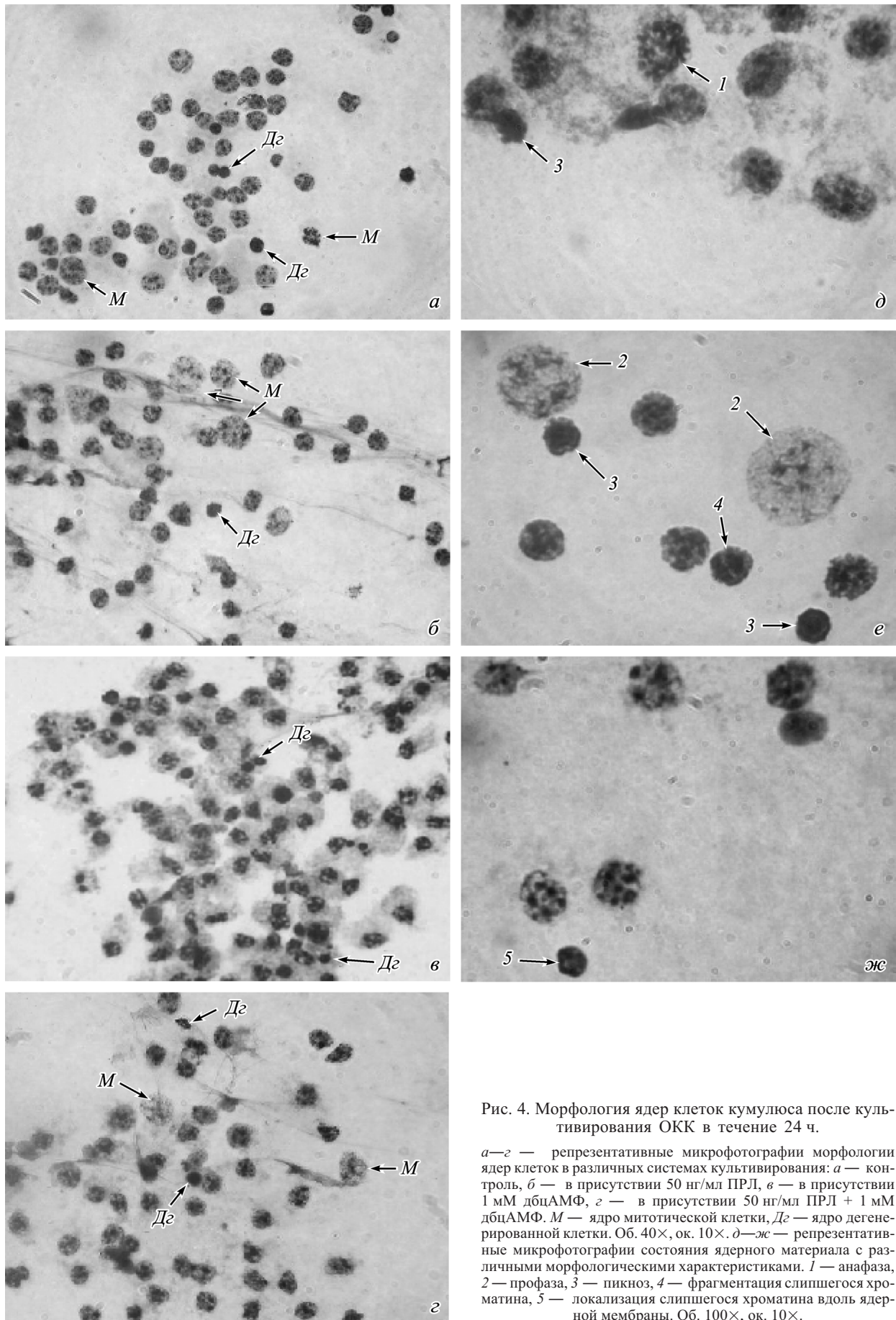


Рис. 4. Морфология ядер клеток кумулюса после культивирования ОКК в течение 24 ч.

a—г — репрезентативные микрофотографии морфологии ядер клеток в различных системах культивирования: *a* — контроль, *б* — в присутствии 50 нг/мл ПРЛ, *в* — в присутствии 1 мМ дбцАМФ, *г* — в присутствии 50 нг/мл ПРЛ + 1 мМ дбцАМФ. *М* — ядро митотической клетки, *Дг* — ядро дегенерированной клетки. Об. 40×, ок. 10×. *д—ж* — репрезентативные микрофотографии состояния ядерного материала с различными морфологическими характеристиками. *1* — анафаза, *2* — профаза, *3* — пикноз, *4* — фрагментация слипшегося хроматина, *5* — локализация слипшегося хроматина вдоль ядерной мембраны. Об. 100×, ок. 10×.

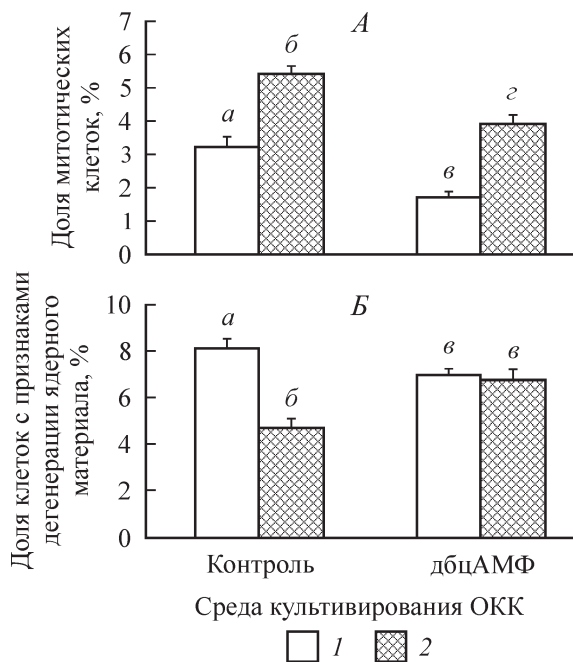


Рис. 5. Влияние ПРЛ на пролиферативную активность (А) и уровень дегенерации (Б) клеток кумулюса при культивировании ОКК коров в отсутствие и в присутствии 1 мМ дбцАМФ.

Достоверные различия между сравниваемыми средними значениями: $a, бP < 0.001$, $a, вP < 0.01$, $б, вP < 0.001$, $б, зP < 0.01$, $в, зP < 0.001$ (А); $a, бP < 0.001$, $б, вP < 0.01$ (Б). Время культивирования ОКК 24 ч. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

фолликулостимулирующий гормон (путем повышения внутриклеточной концентрации цАМФ) и регуляторные факторы, синтезируемые самим ооцитом (Buccione et al., 1990; Vanderhyden, 1993; Gilchrist et al., 2004). Показано, что добавление производных цАМФ или активатора аденилатциклазы форсколина в среду культивирования ОКК свиней и крыс также приводит к повышению разрыхления кумулюса (Vanderhyden, 1993; Zhang et al., 2005). В нашем исследовании дбцАМФ оказывал стимулирующее влияние на экспансию клеток кумулюса коров. ПРЛ частично подавлял разрыхление кумулюса, индуцированное дбцАМФ, хотя в контрольной среде он вызывал противоположный эффект. Это свидетельствует о том, что в кумулюсных клетках, как и в ооцитах, может иметь место взаимодействие сигнальных каскадов, активируемых ПРЛ и дбцАМФ, которое в конечном итоге влияет на степень экспансии кумулюса. Напротив, наблюдаемое в контрольной среде стимулирующее влияние ПРЛ на экспан-

сию кумулюса не опосредуется цАМФ-зависимым механизмом и, вероятно, является следствием стимуляции ядерного созревания ооцитов (которые в свою очередь регулируют эту экспансию), т. е. носит паракринный характер.

Как известно, экспансии клеток кумулюса сопутствует снижение их пролиферативной активности (Schuetz et al., 1996). Кроме того, внесение фолликулостимулирующего гормона или дбцАМФ в среду созревания ОКК приводит к уменьшению интенсивности пролиферации кумулюсных клеток (Armstrong et al., 1996; Schuetz et al., 1996). В наших экспериментах дбцАМФ также ингибировал пролиферативную активность клеток кумулюса, тогда как ПРЛ оказывал на нее стимулирующее влияние, сходное с таковым, обнаруженным в культуре клеток гранулы коров (Лебедева и др., 1995). При этом на величину ростстимулирующего эффекта ПРЛ не влияло присутствие дбцАМФ в среде созревания ОКК, а степень ростингибирующего влияния циклического нуклеотида не зависела от присутствия гормона. Полученные данные указывают на то, что возможный участок сопряжения сигнальных каскадов, индуцированных ПРЛ и дбцАМФ в клетках кумулюса, находится дальше от начала каскадов, чем соответствующие участки, отвечающие за регуляцию клеточной пролиферации. Следовательно, модуляция пролактином концентрации цАМФ в кумулюсных клетках является маловероятным событием.

К настоящему времени установлено, что атрезия (процесс физиологической дегенерации) антральных фолликулов инициируется в первую очередь в пределах слоя клеток гранулы и происходит путем апоптоза (Markström et al., 2002). Хотя апоптотических процессов практически не наблюдается в клетках кумулюса, окружающих незрелые ооциты, они подвергаются спонтанному апоптозу при созревании ОКК как *in vivo*, так и *in vitro* (Ikeda et al., 2003; Torner et al., 2004). При этом повышение степени дегенерации кумулюса связано со снижением способности ооцитов к дальнейшему развитию (Ikeda et al., 2003). Ранее было показано, что ПРЛ может тормозить деструктивные процессы в клетках гранулы коров (Лебедева и др., 2004). В настоящей работе было выявлено аналогичное действие гормона на клетки кумулюса, которые являются субпопуляцией клеток гранулы. В свою очередь дбцАМФ подавлял ингибирующее влияние ПРЛ на процессы дегенерации в кумулюсных клетках, но не влиял на их дегенерацию в контрольной среде. Поэтому можно предположить, что реализация данного эффекта ПРЛ детерминирована сопряжением его сигнального каскада с цАМФ-зависимым внутриклеточным путем. Кроме того, эти данные не поддерживают гипотезу о возможном

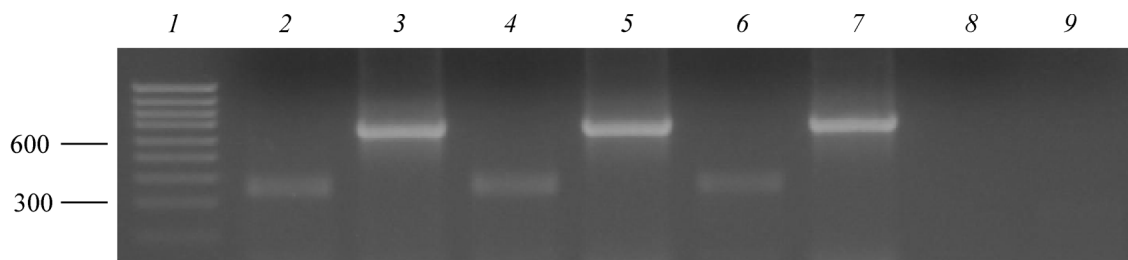


Рис. 6. ОТ-ПЦР-анализ экспрессии мРНК длинной изоформы рецептора ПРЛ в овариальных клетках коров.

Дорожки: 1 — маркеры длины в парах нуклеотидных оснований; 2, 4, 6 — ПЦР-продукт, соответствующий длинной изоформе рецептора ПРЛ; 3, 5, 7 — ПЦР-продукт, соответствующий β -актину; 8 — ОТ-ПЦР, отрицательный контроль; 9 — ПЦР, отрицательный контроль; 2, 3 — желтое тело; 4, 5 — клетки гранулы; 6, 7 — клетки кумулюса.

регуляторном влиянии ПРЛ на концентрацию цАМФ в кумулюсных клетках.

Таким образом, результаты настоящего исследования свидетельствуют о взаимодействии сигнальных каскадов, индуцированных ПРЛ и цАМФ в ОКК коров, причем участок сопряжения этих каскадов в ооцитах, по-видимому, отличается от такового в клетках кумулюса. В ооцитах тормозящий эффект ПРЛ на ингибирующее мейоз влияние цАМФ может быть обусловлен гормональной стимуляцией деградации циклического нуклеотида. Напротив, в клетках кумулюса взаимодействие этих сигнальных каскадов, вероятно, происходит на участке, достаточно удаленном от их начала.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 07-04-01485).

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.
- Лакин Г. Ф. 1990. Биометрия. М.: Высш. шк. 352 с.
- Лебедева И. Ю., Кибардина Т. В., Кузьмина Т. И. 2005. Участие клеток гранулезы в опосредовании действия пролактина и соматотропина на ооцит-кумуляные комплексы коров *in vitro*. *Цитология*. 47 (10) : 882—888.
- 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., Шоккин 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., 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.
- Лебедева И. Ю., Скотти О. С., Кузьмина Т. И. 2006. Модуляция пролактином ингибирующего влияния теофиллина на созревание ооцит-кумуляных комплексов коров *in vitro*. *Цитология*. 48 (12) : 1010—1015.
- Armstrong D. T., Xia P., de Gannes G., Tekpetey F. R., Khamisi F. 1996. Differential 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.
- Bilodeau-Goeseels S. 2003. Effects of phosphodiesterase inhibitors on spontaneous nuclear maturation and cAMP concentrations in bovine oocytes. *Theriogenology*. 60 : 1679—1690.
- 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.
- Buccione R., Vanderhyden B. C., Caron P. J., Eppig J. J. 1990. FSH-induced expansion of the mouse cumulus oophorus *in vitro* is dependent upon a specific factor(s) secreted by the oocyte. *Develop. Biol.* 138 : 16—25.
- Calder M. D., Caveney A. N., Westhusin M. H., Watson A. J. 2001. Cyclooxygenase-2 and prostaglandin E₂ receptor messenger RNAs are affected by bovine oocyte maturation time and cumulus-oocyte complex quality, and PGE₂ induces moderate expansion of the bovine cumulus *in vitro*. *Biol. Reprod.* 65 : 135—140.

Conti M., Andersen C. B., Richard F., Mehats C., Chun S.-Y., Horner K., Jin C., Tsafri A. 2002. Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. *Mol. Cell Endocrinol.* 187 : 153—159.

Degen J. L., Neubauer M. G., Degen S. J. F., Seyfried C. E., Morris D. R. 1983. Regulation of protein synthesis in mitogen-activated bovine lymphocytes. Analysis of actin-specific and total mRNA accumulation and utilization. *J. Biol. Chem.* 258 : 12 153—12 162.

Demura R., Suzuki T., Komatsu H., Jibiki K., Odagiri E., Demura H., Shizume K. 1986. Prolactin interacts with gonadotropin through a suppression of cAMP production probably as a LH-sensitive adenylate cyclase inhibitor. *Endocrinol. Jap.* 33 : 29—35.

Gilchrist R. B., Ritter L. J., Armstrong D. T. 2004. Oocyte-somatic cell interactions during follicular development in mammals. *Anim. Reprod. Sci.* 82—83 : 431—446.

Gitay-Goren H., Lindenbaum E. S., Kraiem Z. 1989. Prolactin inhibits hCG-stimulated steroidogenesis and cAMP accumulation, possibly 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.

Ikeda S., Imai H., Yamada M. 2003. Apoptosis in cumulus cells during *in vitro* maturation of bovine cumulus-enclosed oocytes. *Reproduction*. 125 : 369—376.

Jabbour H. N., Kelly P. A. 1997. Prolactin receptor subtypes: a possible mode of tissue specific regulation of prolactin function. *Rev. Reprod.* 2 : 14—18.

Jolly P. D., Smith P. R., Heath D. A., Hudson N. L., Lun S., Still L. A., Watts C. H., McNatty K. P. 1997. Morphological evidence of apoptosis and the prevalence of apoptotic versus mitotic cells in the membrana granulosa of ovarian follicles during spontaneous and induced atresia in ewes. *Biol. Reprod.* 56 : 837—846.

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.

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.

Markström E., Svensson E. C., Shao R., Svanberg B., Billig H. 2002. Survival factors regulating ovarian apoptosis — dependence on follicle differentiation. *Reproduction*. 123 : 23—30.

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.

Mehlmann L. M. 2005. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction*. 130 : 791—799.

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.

Schuetz A. W., Whittingham D. G., Snowden R. 1996. Alterations in the cell cycle of mouse cumulus granulosa cells during expansion and mucification *in vivo* and *in vitro*. *Reprod. Fertil. Develop.* 8 : 935—943.

Schuler L. A., Nagel R. J., Gao J., Horseman N. D., Kessler M. A. 1997. Prolactin receptor heterogeneity in bovine fetal and maternal tissues. *Endocrinology*. 138 : 3187—3194.

Shimada M., Terada T. 2002. Roles of cAMP in regulation of both MAP kinase and p34 (cdc2) kinase activity during meiotic pro-

gression, especially beyond the MI stage. *Mol. Reprod. Develop.* 62 : 124—131.

Sirard M. A. 2001. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology*. 55 : 1241—1254.

Sirard M. A., First N. L. 1988. *In vitro* inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine. *Biol. Reprod.* 39 : 229—234.

Turner H., Brüßow K. P., Alm H., Ratky J., Pöhland R., Tuchscherer A., Kanitz W. 2004. Mitochondrial aggregation patterns and activity in porcine oocytes and apoptosis in surrounding cumulus cells depends on the stage of preovulatory maturation. *Theriogenology*. 61 : 1675—1689.

Vanderhyden B. C. 1993. Species differences in the regulation of cumulus expansion by an oocyte-secreted factor(s). *J. Reprod. Fertil.* 98 : 219—227.

Vlahos N. P., Bugg E. M., Shamblott 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.

Zhang M., Tao Y., Zhou B., Xie H., Wang F., Lei L., Huo L., Sun Q., Xia G. 2005. Atrial natriuretic peptide inhibits the actions of FSH and forskolin in meiotic maturation of pig oocytes via different signalling pathways. *J. Mol. Endocrinol.* 34 : 459—472.

Поступила 10 X 2007

INTERACTION OF SIGNAL CASCADES INDUCED BY CAMP AND PROLACTIN IN BOVINE OOCYTE-CUMULUS COMPLEXES

I. Yu. Lebedeva,^{1,2,*} G. N. Singina,¹ N. A. Volkova,¹ A. N. Mormishev,¹ A. K. Golubev,² N. A. Zinovieva¹

¹ All-Russian State Research Institute of Animal Breeding, Podolsk,
and ² Department of Animal Genetics, Breeding and Biotechnology, St. Petersburg State Agrarian University,
* irldev@mail.ru

Prolactin (PRL) is one of the pituitary hormones participating in the control of mammalian folliculo- and oogenesis. In the present study, the joint effect of PRL (50 ng/ml) and dibutyryl cAMP (dbcAMP, 1 mM) on oocyte maturation and the morphologic-functional state of surrounding cumulus cells was investigated *in vitro*. It has been shown that PRL totally suppresses the braking impact of dbcAMP on meiosis reinitiation and the completion of oocyte nuclear maturation. Furthermore, PRL partly inhibited cumulus expansion induced by dbcAMP, although it exerted the opposite effect in the control medium. In the presence of PRL, the inhibitory impact of dbcAMP on the proliferative activity of cumulus cells and on the PRL-elicited braking of destructive processes in the cells has been found. In cumulus cells, mRNA expression of PRL receptor long isoform was revealed by the RT-PCR method. The data obtained suggest an interaction of signal cascades induced by PRL and cAMP in bovine oocyte-cumulus complexes, with the coupling site of these cascades in oocytes being apparently different from that in cumulus cells.

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