

ПУТИ РЕАЛИЗАЦИИ МОДУЛИРУЮЩЕГО ВЛИЯНИЯ ПРОЛАКТИНА НА цАМФ-ЗАВИСИМЫЙ МЕХАНИЗМ РЕГУЛЯЦИИ МЕЙОЗА В ООЦИТАХ КОРОВ

© И. Ю. Лебедева,^{1,2,*} Г. Н. Сингина,¹ Л. К. Эрнст,¹ А. К. Голубев²

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

Циклический АМФ является одним из ключевых регуляторов мейоза у млекопитающих. В представленной работе изучались пути реализации выявленного ранее модулирующего влияния пролактина (ПРЛ) на цАМФ-зависимый механизм регуляции мейоза в ооцитах коров. Проведено сравнительное исследование индивидуального и совместного влияния ПРЛ (50 нг/мл) и активатора аденилатциклазы форсколина (ФК, 20 мкМ) на реинициацию мейоза и завершение ядерного созревания ооцитов, окруженных клетками кумулюса и лишенных этих клеток. Показано, что характер влияния ПРЛ на возобновление мейоза в ооцитах, освобожденных от кумулюсных клеток, зависит от присутствия ФК в среде культивирования. Кроме того, реализация этого влияния не связана с активацией цитоплазматических изоформ протеинкиназы С. Также обнаружено, что ПРЛ ингибирует тормозящее влияние ФК на завершение ядерного созревания ооцитов как в присутствии, так и в отсутствие клеток кумулюса. Полученные результаты свидетельствуют о том, что ПРЛ может модулировать функционирование цАМФ-зависимого механизма регуляции мейоза путем прямого воздействия на ооциты коров, причем реализация этого воздействия не зависит от метаболического сопряжения ооцитов с клетками кумулюса.

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

Принятые сокращения: ДО — денудированные ооциты, т. е. ооциты, освобожденные от клеток кумулюса, Дп — диплотена, МII — метафаза II, ОКК — ооцит-кумуляные комплексы, ПРЛ — пролактин, TI — телофаза I, ФК — форсколин.

Пролактин (ПРЛ) является одним из гипофизарных гормонов, участвующих в контроле репродуктивной функции у млекопитающих (Dusza, Tilton, 1990; Bartke, 1999), однако его роль в регуляции оогенеза до сих пор остается малопонятной. Ряд данных указывает на то, что нарушения в проведении сигнала при взаимодействии ПРЛ с овариальными клетками на рецепторном или пострецепторном уровне приводят к ухудшению фертильности самок, в том числе к снижению качества ооцитов и их способности к дальнейшему развитию (Jinno et al., 1997; Vole-Feysot et al., 1998). Одна из функций ПРЛ может быть связана с регуляцией мейоза, поскольку у мышей с инактивированным геном рецептора ПРЛ наблюдалась овуляция ооцитов, заблокированных на стадии диплотены (Vole-Feysot et al., 1998). Кроме того, преовуляторное повышение содержания ПРЛ в крови и фолликулярной жидкости обнаружено у различных видов млекопитающих (Chang et al., 1993; Wise, Maurer, 1994; Mendes et al., 2001), хотя его физиологическое значение в регуляции завершающих стадий мейоза до сих пор не установлено. Недавно в ооцитах и сопряженных с ними клетках кумулюса у крыс и овец была выявлена локализация рецепторов ПРЛ (Коток и др., 2000; Picazo et al., 2004), а у мышей — наличие мРНК длинной и коротких форм его рецептора (Kiarakou et al., 2005). Также обнаружено стимулирующее влияние

ПРЛ *in vitro* на ядерное созревание ооцитов коров и их потенцию к дальнейшему развитию (Кузьмина и др., 2001). Эти данные свидетельствуют о возможности непосредственного влияния гормона на ооцит-кумуляные комплексы (ОКК).

Как известно, цАМФ-зависимый механизм является ключевым в регуляции мейоза млекопитающих (Mattioli, 1994; Conti et al., 2002). На модели культивирования ОКК коров ранее было показано наличие сопряжения внутриклеточных сигнальных каскадов, активируемых ПРЛ и цАМФ в ооцитах и клетках кумулюса (Лебедева и др., 2006, 2008). При этом ПРЛ ингибировал тормозящее мейоз влияние реагентов, повышающих внутриклеточную концентрацию цАМФ. Кроме того, в кумулюсных клетках нами была выявлена мРНК длинной изоформы рецепторов ПРЛ, ответственной за активацию его сигнальных каскадов в клетках-мишенях (Лебедева и др., 2008). Вместе с тем полученные данные не позволили охарактеризовать роль прямого (не опосредованного клетками кумулюса) пути в реализации модулирующего мейоз действия ПРЛ, а также идентифицировать внутриклеточные посредники, участвующие в проведении гормонального сигнала в ооцитах. В этой связи нами было выполнено сравнительное исследование индивидуального и совместного влияния ПРЛ и активатора аденилатциклазы форсколина

(ФК) на реинициацию мейоза и завершение ядерного созревания ооцитов коров, окруженных клетками кумулюса и лишенных этих клеток. Кроме того, при использовании калпостина С, неселективного ингибитора протеинкиназы С, была охарактеризована ее роль в реализации модулирующего мейоз действия ПРЛ.

Материал и методика

Объектом исследования служили ОКК и денудированные, т. е. освобожденные от клеток кумулюса, ооциты (ДО) 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 мкг/мл стрептомицина).

Для выделения и культивирования клеток использовали среду ТС-199 (с L-глутамином и NEPES), фетальную бычью сыворотку, ФК, коллагеназу II, гентамицин, лактат кальция, бычий сывороточный альбумин, пируват натрия (Sigma, США), минеральное масло (ICN, США), препарат гипофизарного бычьего ПРЛ (Эндокринологический научный центр РАМН, Москва), калпостин С (Calbiochem, Германия).

Ооцит-кумулюсные комплексы выделяли путем расщепления стенки фолликулов диаметром 2—6 мм и промывали 3 раза в среде ТС-199, содержащей 2 мг/мл бычьего сывороточного альбумина и 50 мкг/мл гентамицина. Для экспериментов отбирали ооциты округлой формы, с гомогенной цитоплазмой, равномерной по ширине зоной пеллюцида, окруженные многослойным компактным кумулюсом. Для получения ДО клетки кумулюса удаляли путем обработки ОКК коллагеназой II (1 мг/мл) в течение 25 мин при 37 °С и последующего ресуспендирования комплексов в среде с коллагеназой с помощью микропипетки, имеющей диаметр отверстия 130 мкм. Культивирование ОКК и ДО проводили в 6-луночных планшетах группами по 15—20 шт. в 500 мкл среды, покрытой минеральным маслом, при 38.5 °С в атмосфере с 5 % CO₂ и 90%-ной влажностью. Время инкубации составляло 8 ч (ДО) и 24 ч (ОКК и ДО). 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 опытных группах в среду вносили ФК (20 мкМ), ПРЛ (50 нг/мл), калпостин С (100 нМ) или одновременно ФК, ПРЛ и калпостин С в различных сочетаниях. Все манипуляции с ОКК и ДО, а также их морфологическую оценку выполняли с помощью стереомикроскопа Nikon. Подготовку и оценку препаратов хромосом ооцитов проводили, как описано ранее (Лебедева и др., 2005). Исследование ядерного материала в ооцитах выполняли с помощью микроскопа Opton (ФРГ) при увеличении 1000×.

Эксперименты по культивированию ОКК и ДО были выполнены в 4—5 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 $P < 0.05$.

Результаты

Во всех экспериментах нами был использован бычий ПРЛ в концентрации 50 нг/мл, в которой он стимулировал завершение ядерного созревания ооцитов и подавлял тормозящее мейоз действие реагентов, повышающих внутриклеточный уровень цАМФ, при культивировании ОКК коров (Кузьмина и др., 2001; Лебедева и др., 2006, 2008). Для ингибирования мейоза был применен активатор аденилатциклазы форсколин (20 мкМ), поскольку в этой концентрации он эффективно повышает содержание цАМФ как в ОКК, так и в ДО коров (Bilodeau-Goeseels et al., 2007).

На первом этапе исследований было охарактеризовано влияние ФК и ПРЛ на завершение ядерного созревания ооцитов, окруженных клетками кумулюса. Было установлено, что внесение 20 мкМ ФК в контрольную среду приводит к достоверному уменьшению ($P < 0.01$) доли ооцитов, достигших стадий телофазы I (ТI) или метафазы II (МII) через 24 ч культивирования (рис. 1), что обусловило использование этой концентрации в дальнейших экспериментах. В то же время ПРЛ увеличивал относительное число созревших клеток и в отсутствие ($P < 0.05$), и в присутствии ФК ($P < 0.001$). При этом в среде с ФК стимулирующее влияние гормона усиливалось, что приводило к повышению доли клеток, достигших завершающих стадий мейоза, до таковой в отсутствие ФК. Обработка данных методом дисперсионного анализа также показала, что ядерное созревание ооцитов зависит от наличия ФК и ПРЛ в среде культивирования ОКК ($P < 0.01$), а также от взаимодействия этих факторов ($P < 0.05$).

На втором этапе исследований был проведен анализ влияния ПРЛ и ФК на ядерное созревание ДО. В экспериментах были использованы только ооциты, полностью очищенные от кумулюсных клеток (рис. 2, а). Лишенные кумулюса ооциты имели высокую потенцию к ядерному созреванию, при этом доля клеток, достигших стадии ТI или МII через 24 ч культивирования, составляла в контроле 80.2 ± 2.2 % (рис. 3). Этим данным соответствовала морфология ДО, у которых наблюдалось наличие первого полярного тельца (рис. 2, б). При культивировании ооцитов, лишенных кумулюса, в присутствии ФК было обна-

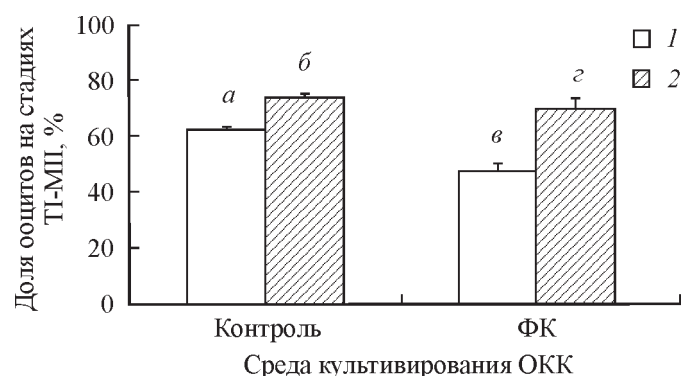


Рис. 1. Влияние ПРЛ на завершение ядерного созревания ооцитов, окруженных кумулюсом, при их культивировании в отсутствие и в присутствии 20 мкМ ФК.

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, б $P < 0.05$, в, г $P < 0.001$. Время культивирования ОКК — 24 ч.

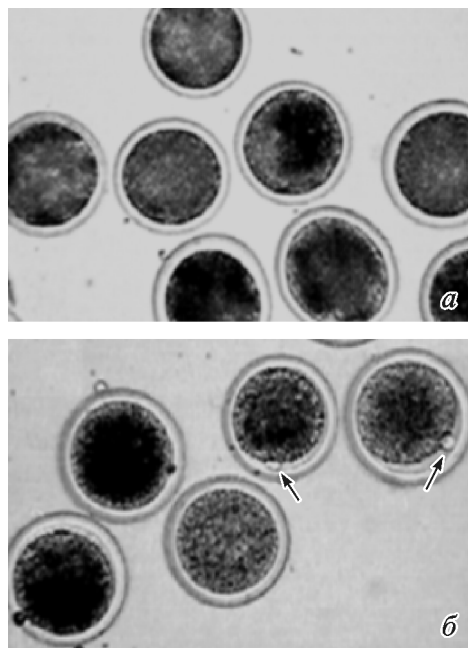


Рис. 2. Репрезентативные микрофотографии морфологии денудированных ооцитов до (а) и после (б) культивирования в течение 24 ч.

Стрелками показаны полярные тельца. Об. 20×, ок. 10×.

ружено снижение относительного числа клеток на завершающих стадиях мейоза по сравнению с контролем ($P < 0.001$). Хотя ПРЛ не влиял на завершение ядерного созревания ДО в контрольной среде, он повышал выход созревших ооцитов до уровня контроля в среде, содержащей ФК ($P < 0.01$).

Для изучения влияния ПРЛ и ФК на реинициацию мейоза в ДО культивирование проводили в течение 8 ч, поскольку через 6 ч инкубации (когда около 50 % ОКК возобновляет мейоз в нашей системе культивирования; Лебедева и др., 2008) практически все клетки в контрольной группе еще находились на стадии диплотены (Дп). Было обнаружено, что в среде с ФК доля ооцитов,

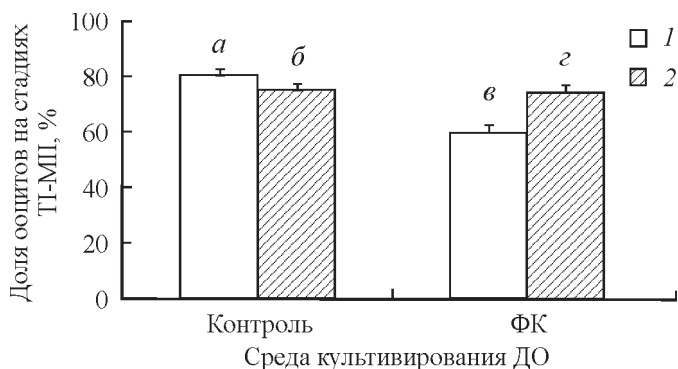


Рис. 3. Влияние ПРЛ на завершение ядерного созревания ооцитов, лишенных кумулюса, при их культивировании в отсутствие и в присутствии 20 мкМ ФК.

1 — без добавления ПРЛ, 2 — в присутствии 50 нг/мл ПРЛ. Каждый столбик — среднее для 5 экспериментов. а–г — то же, что и на рис. 1. Достоверные различия между сравниваемыми средними значениями: а, б $P < 0.001$, в, г $P < 0.01$. Время культивирования ДО — 24 ч.

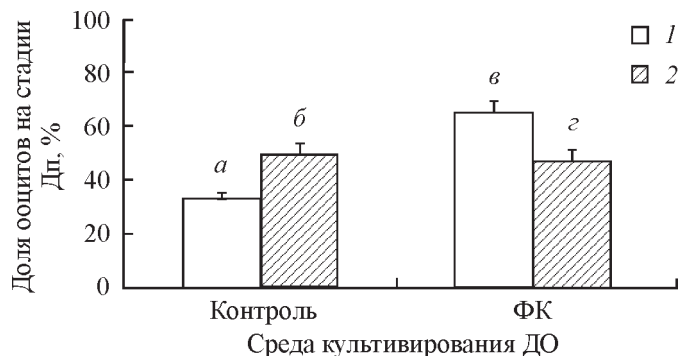


Рис. 4. Влияние ПРЛ на реинициацию мейоза ооцитов, лишенных кумулюса, при их культивировании в отсутствие и в присутствии 20 мкМ ФК.

1 — без добавления ПРЛ, 2 — в присутствии 50 нг/мл ПРЛ. Каждый столбик — среднее для 5 экспериментов. а–г — то же, что и на рис. 1. Достоверные различия между сравниваемыми средними значениями: а, б $P < 0.05$, в, г $P < 0.001$, в, г $P < 0.05$. Время культивирования ДО — 8 ч.

остающихся на стадии Дп, выше ($P < 0.001$), чем в контроле (рис. 4). ПРЛ также тормозил возобновление мейоза в ДО, хотя и слабее ($P < 0.05$). Напротив, внесение гормона в среду, содержащую ФК, приводило к уменьшению относительного числа ооцитов на стадии диплотены ($P < 0.05$). В целом дисперсионный анализ данных показал, что влияние ПРЛ на реинициацию мейоза, как и на завершение ядерного созревания ДО, зависит от присутствия ФК в среде культивирования ($P < 0.01$).

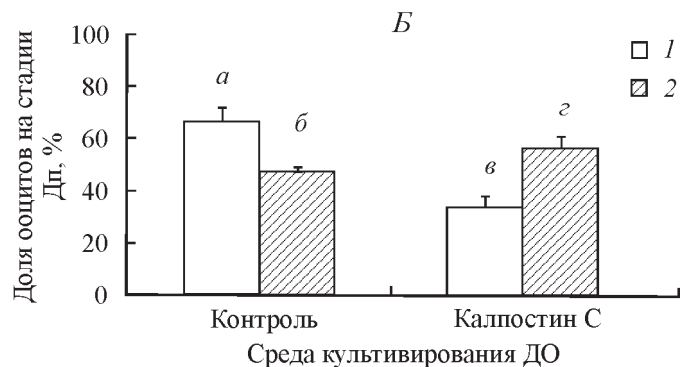
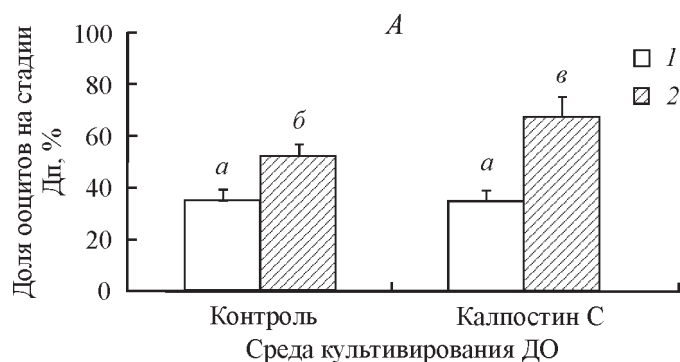


Рис. 5. Влияние ПРЛ и калпостина С (100 нМ) на реинициацию мейоза ооцитов, лишенных кумулюса, при их культивировании в отсутствие (А) и в присутствии (Б) 20 мкМ форсколина.

1 — без добавления ПРЛ, 2 — в присутствии 50 нг/мл ПРЛ. Каждый столбик — среднее для 4 экспериментов. а–г — то же, что и на рис. 1. Достоверные различия между сравниваемыми средними значениями: а, б $P < 0.05$, в, г $P < 0.001$ (А); а, б $P < 0.01$, в, г $P < 0.001$ (Б). Время культивирования ДО — 8 ч.

В последней серии экспериментов по культивированию ДО было исследовано влияние калпостина С в концентрации 100 нМ ($IC_{50} = 50$ нМ для ингибирования протеинкиназы С) на реинициацию мейоза ДО в присутствии пролактина и ФК. Калпостин не влиял на долю ооцитов, остающихся на стадии Дп через 8 ч культивирования, ни в контрольной среде, ни в среде с ПРЛ (рис. 5, А). Тормозящий мейоз эффект ПРЛ был даже более выражен в присутствии ингибитора протеинкиназы С ($P < 0.001$). Тем не менее калпостин подавлял ингибирующее мейоз действие ФК ($P < 0.001$), понижая долю ооцитов, находящихся на стадии Дп, до таковой в контрольной среде без ФК (рис. 5, А, Б). Внесение ПРЛ в среду, содержащую ФК и калпостин С, приводило к увеличению ($P < 0.01$) относительного числа ооцитов, не возобновивших мейоз (рис. 5, Б). Дисперсионный анализ данных также показал, что влияние ПРЛ на реинициацию мейоза в среде с ФК зависит от присутствия калпостина ($P < 0.001$).

Обсуждение

Как известно, ооциты копытных животных менее чувствительны к регуляторному влиянию цАМФ на мейоз, чем ооциты грызунов и приматов (Hinrichs, 1996). Реагенты, повышающие внутриклеточную концентрацию цАМФ, лишь кратковременно тормозят реинициацию мейоза и ингибируют переход от метафазы I к метафазе II в ооцитах крупного рогатого скота (Sirard, First, 1988; Aktas et al., 1995; Thomas et al., 2002). Результаты настоящей работы о влиянии ФК на ядерное созревание ооцитов коров, а также полученные нами ранее данные о сходном влиянии теофиллина, неселективного ингибитора фосфодиэстераз, и дибутирильного производного цАМФ (Лебедева и др., 2006, 2008) согласуются с этой точкой зрения. При этом ПРЛ ингибировал тормозящее мейоз действие всех трех использованных нами цАМФ-повышающих реагентов на ОКК. В то же время влияние ПРЛ на ядерное созревание ооцитов, лишенных кумулюса, было исследовано впервые. Оказалось, что гормон также подавляет ингибирующее влияние ФК на завершение ядерного созревания ДО, хотя не влияет на этот процесс в отсутствие активатора аденилатциклазы. Следовательно, выявленное нами ранее модулирующее влияние ПРЛ на цАМФ-зависимый механизм регуляции мейоза может достигаться путем прямого воздействия на ооциты коров. В пользу этого вывода свидетельствуют данные других авторов, выявивших рецепторы ПРЛ или их мРНК в ооцитах различных видов млекопитающих (Коток и др., 2000; Picazo et al., 2004; Kiarekou et al., 2005). При этом наличие или отсутствие щелевых контактов между ооцитом и кумулюсом, которые необходимы для метаболического сопряжения половых и соматических клеток, не является детерминирующим фактором для реализации гормонального воздействия.

Исследование влияния ПРЛ на реинициацию мейоза в ооцитах, лишенных кумулюса, выявило его зависимость от внутриклеточной концентрации цАМФ. В контрольной среде гормон оказывал ингибирующее влияние на возобновление мейоза в ДО. Напротив, в присутствии 20 мкМ ФК, который в этой концентрации эффективно повышает уровень цАМФ в ДО коров (Bilodeau-Goeseels et al., 2007), ПРЛ стимулировал реинициацию мейоза в ооцитах, преодолевая тормозящее влияние активатора

аденилатциклазы. Эти данные также свидетельствуют о том, что пересечение сигнальных каскадов, индуцированных ПРЛ и цАМФ, происходит непосредственно в ооцитах коров. Ранее нами было показано, что влияние ПРЛ на цАМФ-зависимый внутриклеточный путь в ооцитах может быть обусловлено гормональной стимуляцией деградации циклического нуклеотида, хотя не исключена и возможность непосредственной модуляции активности эффекторов цАМФ, например протеинкиназы А (Лебедева и др., 2006, 2008). Однако регуляция реинициации мейоза ооцитов млекопитающих зависит от активации протеинкиназы А в клетках кумулюса, тогда как ее активация в ооцитах, по-видимому, не вовлекается в этот процесс (Richard et al., 1997; Lu et al., 2001). Другой возможной мишенью для действия ПРЛ являются члены недавно идентифицированного семейства белков-эффекторов, активируемых цАМФ, — ЕРАС (Exchange Proteins Activated by cAMP), однако их роль в регуляции мейоза пока неизвестна (Bos, 2003). Вместе с тем установлено, что ЕРАС могут образовывать сигнальные комплексы, включающие в свой состав одну из изоформ фосфодиэстераз, в первую очередь фосфодиэстеразу 3 (Raymond et al., 2007), локализация которой выявлена в ооцитах млекопитающих, в том числе у коров (Mayes, Sirard, 2002; Thomas et al., 2002). Таким образом, наиболее вероятным участком сопряжения сигнальных каскадов, индуцированных ПРЛ и цАМФ в ооцитах, является фосфодиэстераза 3, которая регулирует деградацию цАМФ в половых клетках.

Сигнальный путь, опосредуемый членами семейства протеинкиназы С, рассматривается многими исследователями как один из основных внутриклеточных механизмов, участвующих в регуляции мейоза млекопитающих как на уровне кумулюса, так и на уровне самого ооцита (Lu et al., 2001; Fan et al., 2002; Avazeri et al., 2004). Изоформы протеинкиназы С, входящие в это семейство, условно делят на три группы на основании зависимости их активности от ионов кальция и диацилглицерола: классические (α , β и γ), новые (δ , ϵ , η и θ) и атипичные (ζ , ι и λ). К настоящему времени выявлена локализация некоторых из этих изоформ, главным образом классических, в ооцитах мышей и человека, а также их транслокация в процессе мейоза (Avazeri et al., 2004; Wu et al., 2006). Показано, в частности, что изоформы α и β присутствуют в цитоплазме ооцитов мышей на стадии диплотены и мигрируют в ядро перед разрушением зародышевого пузырька, тогда как изоформа γ остается цитоплазматической. При этом в поддержании блокады мейоза и в индукции его реинициации участвуют разные изоформы протеинкиназы С, локализованные как в цитоплазме, так и в ядре (Avazeri et al., 2004). Вместе с тем большая часть исследований роли сигнального пути, опосредуемого протеинкиназой С, в регуляции мейоза у млекопитающих была выполнена при использовании неселективных активаторов и ингибиторов протеинкиназы С, которые могут модулировать активность только цитоплазматических изоформ. Полученные результаты достаточно противоречивы и зависят от наличия окружающих ооцит клеток кумулюса, характера реинициации мейоза (спонтанный или индуцированный) и вида исследуемого животного (Downs et al., 2001; Lu et al., 2001; Fan et al., 2002; Shimada, Terada, 2002). Выявленные противоречия, по-видимому, связаны с различием в изоформах протеинкиназы С, которые находятся в соматических и половых клетках и участвуют в регуляции мейоза у разных видов, а также с их внутриклеточной локализацией.

Установлено, что протеинкиназа С является вторичным мессенджером в передаче сигнала при взаимодействии ПРЛ с рядом клеток-мишеней (Bole-Feysot et al., 1998). Кроме того, показана возможность взаимодействия между сигнальными каскадами, опосредованными протеинкиназой А и протеинкиназой С, в ооците и клетках кумулюса (Downs et al., 2001; Shimada, Terada, 2002). В этой связи нами было исследовано участие сигнального пути, активируемого протеинкиназой С, в реализации модулирующего влияния ПРЛ на цАМФ-зависимый механизм регуляции мейоза в ооцитах, лишенных кумулюса. В наших экспериментах тормозящее влияние ПРЛ на мейоз не зависело от присутствия калпостина С, неселективного ингибитора протеинкиназы С, хотя последний подавлял ингибирующее мейоз действие ФК на ДО, что согласуется с данными других авторов (Нота, 1991; Downs et al., 2001). Следовательно, тормозящее мейоз влияние ПРЛ на ДО в контрольной среде не было связано с активацией сигнальных путей, зависящих от цАМФ или цитоплазматических изоформ протеинкиназы С. Кроме того, ПРЛ и ингибитор протеинкиназы С оказывали однонаправленное влияние на тормозящее мейоз действие ФК, что свидетельствует о том, что активация изоформ протеинкиназы С, локализованных в цитоплазме ооцитов, не может являться звеном в цепи сигнального каскада, индуцируемого ПРЛ и приводящего к реинициации мейоза в присутствии ФК. В то же время ПРЛ тормозил возобновление мейоза в ДО в случае одновременного присутствия ФК и калпостина С, что, вероятно, было следствием влияния калпостина С, понижающего уровень цАМФ в ооцитах (Downs et al., 2001).

В целом данные представленного исследования показывают, что ПРЛ может модулировать функционирование цАМФ-зависимого механизма регуляции мейоза путем прямого воздействия на ооциты коров, которое не связано с активацией цитоплазматических изоформ протеинкиназы С. При этом наличие метаболического сопряжения между ооцитом и клетками кумулюса не является детерминирующим фактором для реализации гормонального воздействия.

Авторы выражают благодарность проф. Н. Парвизи и проф. Ф. Элссесер (N. Parvizi and F. Elsaesser, Institute of Animal Science, Германия), любезно предоставившим калпостин С и форсколин для проведения исследований.

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

Список литературы

Коток Т., Богорад Р. Л., Смирнов А. Н., Туровецкий В. М., Смирнова О. В. 2000. Влияние перивультарного дисбаланса пролактина на экспрессию рецепторов пролактина в клетках яичника крысы. Онтогенез. 31 (2) : 144—151.

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., Сингина Г. Н., Волкова Н. А., Мормышев А. Н., Голубев А. К., Зиновьева Н. А. 2008. Взаимодействие сигнальных каскадов, индуцированных цАМФ и пролактином в ооцит-кумуляных комплексах коров. Цитология. 50 (8) : 734—742.

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.

Aktas H., Wheeler M. B., Rosenkrans C. F. Jr., First N. L., Leibfried-Rutledge M. L. 1995. Maintenance of bovine oocytes in prophase of meiosis I by high [cAMP]_i. J. Reprod. Fertil. 105 : 227—235.

Avazeri N., Courtot A. M., Lefevre B. 2004. Regulation of spontaneous meiosis resumption in mouse oocytes by various conventional PKC isozymes depends on cellular compartmentalization. J. Cell Sci. 117 : 4969—4978.

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., Sasseville M., Guillemette C., Richard F. J. 2007. Effects of adenosine monophosphate-activated kinase activators on bovine oocyte nuclear maturation *in vitro*. Mol. Reprod. Develop. 74 : 1021—1034.

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. Endocr. Rev. 19 : 225—268.

Bos J. L. 2003. Epac: a new cAMP target and new avenues in cAMP research. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 4 : 733—738.

Chang S. P., Ng H. T., Lan T. L., Chao H. T., Wei T. C., Yang T. S., Ou Yang X. R. 1993. Transient hyperprolactinemia in gonadotropin-stimulated cycles for *in vitro* fertilization and its effect on conception. Chung Hua I Hsueh Tsa Chih Taipei. 51 : 401—406.

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

Downs S. M., Cottom J., Hunzicker-Dunn M. 2001. Protein kinase C and meiotic regulation in isolated mouse oocytes. Mol. Reprod. Develop. 58 : 101—115.

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

Fan H. Y., Li M. Y., Tong C., Chen D. Y., Xia G. L., Song X. F., Schatten H., Sun Q. Y. 2002. Inhibitory effects of cAMP and protein kinase C on meiotic maturation and MAP kinase phosphorylation in porcine oocytes. Mol. Reprod. Develop. 63 : 480—487.

Hinrichs K. 1996. Manipulation of oocyte maturation *in vitro*. Arch. Anim. Breed. 39 (Special issue) : 43—50.

Homa S. T. 1991. Neomycin, an inhibitor of phosphoinositide hydrolysis, inhibits the resumption of bovine oocyte spontaneous meiotic maturation. J. Exp. Zool. 258 : 95—103.

Jinno M., Katsumata Y., Hoshiai T., Nakamura Y., Matsumoto K., Yoshimura Y. 1997. A therapeutic role of prolactin supplementation in ovarian stimulation for *in vitro* fertilization: the bromocriptine-rebound method. J. Clin. Endocrinol. Metab. 82 : 3603—3611.

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.

Lu Z., Xia G., Zhang J. 2001. Protein kinase C, rather than protein kinase A is involved in follicle-stimulating hormone-mediated meiotic resumption of mouse cumulus cell-enclosed oocytes in hypoxanthine-supplemented medium. Mol. Cell Endocrinol. 182 : 225—232.

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.

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.

Raymond D. R., Wilson L. S., Carter R. L., Maurice D. H. 2007. Numerous distinct PKA-, or EPAC-based, signalling complexes allow selective phosphodiesterase 3 and phosphodiesterase 4 coordination of cell adhesion. *Cell Signal.* 19 : 2507—2518.

Richard F. J., Fortier M. A., Sirard M. A. 1997. Role of the cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase in the control of meiotic resumption in bovine oocytes cultured with thecal cell monolayers. *Biol. Reprod.* 56 : 1363—1369.

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

Thomas R. E., Armstrong D. T., Gilchrist R. B. 2002. Differential effects of specific phosphodiesterase isoenzyme inhibitors on bovine oocyte meiotic maturation. *Develop. Biol.* 244 : 215—225.

Wise T., Maurer R. R. 1994. Follicular development, oocyte viability and recovery 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 progestin inhibition of LH surge. *Dom. Anim. Endocrinol.* 11 : 35—58.

Wu X. Q., Zhang X., Li X. H., Cheng H. H., Kuai Y. R., Wang S., Guo Y. L. 2006. Translocation of classical PKC and cortical granule exocytosis of human oocyte in germinal vesicle and metaphase II stage. *Acta Pharmacol. Sin.* 27 : 1353—1358.

Поступила 29 X 2008

REALIZATION PATHWAYS OF PROLACTIN MODULATING INFLUENCE ON THE cAMP-DEPENDENT MECHANISM OF MEIOSIS REGULATION IN BOVINE OOCYTES

I. Yu. Lebedeva,^{1,2,*} G. N. Singina,¹ L. K. Ernst,¹ A. K. Golubev²

¹ All-Russian State Research Institute of Animal Breeding, Podolsk, and ² Department of Animal Genetics, Breeding and Biotechnology, St. Petersburg State Agrarian University, St. Petersburg—Pushkin;

* e-mail: irledv@mail.ru

Cyclic AMP is one of the key regulators of mammalian meiosis. In the present work, realization pathways of the previously revealed modulating influence of prolactin (PRL) on the cAMP-dependent mechanisms of meiosis regulation in bovine oocytes were studied. A comparative investigation of individual and combined effects of PRL (50 ng/ml) and an activator of adenylate cyclase forskolin (FK, 20 μM) on the meiotic reinitiation and nuclear maturation completion in cumulus-enclosed and cumulus-free oocytes was performed. It has been shown that the pattern of PRL influence on the meiotic resumption in oocytes devoid of cumulus cells depends on the presence of FK in the culture medium. Furthermore, realization of this influence is not associated with the activation of cytoplasmic isoforms of protein kinase C. It has been also found that PRL inhibits the retarding action of FK on the completion of oocyte nuclear maturation in both the presence and absence of cumulus cells. The findings suggest that PRL may modulate the functioning of the cAMP-dependent mechanism of meiosis regulation by the direct action on bovine oocytes, with realization of the action being independent of the metabolic coupling of oocytes with cumulus cells.

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