

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПУТЕЙ СИГНАЛЬНОЙ ТРАНСДУКЦИИ В НАТИВНЫХ И ДЕВИТРИФИЦИРОВАННЫХ ООЦИТАХ СВИНЕЙ

© В. Ю. Денисенко, Т. И. Кузьмина¹

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

¹ *электронный адрес: prof.kouzmina@mail.ru*

Идентифицированы пути сигнальной трансдукции при воздействии соматотропина на основе анализа флуктуации содержания кальция во внутриклеточных депо нативных и девитрифицированных ооцитов свиней с использованием ингибиторного анализа. Выявлено, что СТГ, а также ГТФ стимулируют выход Ca^{2+} из внутриклеточных депо, их совместное действие активирует дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо как в нативных, так и в девитрифицированных ооцитах. Обработка ооцитов ингибитором протеинкиназы С не вызвала дополнительного освобождения Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Стимулированное ГТФ освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо связано с гидролизом фосфата. Перемещение Ca^{2+} между внутриклеточными депо, стимулированное ГТФ, не детерминируется гидролизом фосфата. Во взаимодействиях различных внутриклеточных депо вовлекаются протеинкиназа С и микротрубочки. Полученные результаты свидетельствуют о том, что после девитрификации пути сигнальной трансдукции в ооцитах не претерпевают изменений.

Ключевые слова: кальций, ооциты, свиньи, витрификация.

Принятые сокращения: СТГ — соматотропный гормон, ХТЦ — хлортетрациклин, IP_3 — инозитол-1,4,5-трифосфат.

Интерес к криоконсервации ооцитов животных обусловлен возрастающей необходимостью совершенствования и внедрения инновационных клеточных репродуктивных технологий (получение эмбрионов *in vitro*, клонирование и трансгенез) в практику животноводства, медицину и фармакологию. В то время как замораживание эмбрионов успешно применяется на практике, достижения в криоконсервации ооцитов незначительны. Для девитрифицированных ооцитов характерен низкий уровень сохранности, созревания при культивировании *in vitro*, оплодотворяемости и развития из них эмбрионов. Главные отличия криоконсервации ооцитов от эмбрионов обусловлены особенностями строения плазматической мембраны ооцитов, наличием кортикальных гранул, строением веретена на стадии метафазы-II. Ооциты млекопитающих — одни из самых «трудных» клеток для успешной криоконсервации. Технология замораживания ооцитов по сравнению со спермой или эмбрионами имеет ряд технических трудностей в связи с особенностью женских герминальных клеток. Относительно свежим подходом к проблеме криоконсервации без использования дорогостоящего оборудования является витрификация. Разработка эффективных методов витрификации вызывает необходимость изучения механизмов, детерминирующих криорезистентность ооцитов.

Модификация внутриклеточных депо с помощью ГТФ зависит от архитектуры ооцита (Hajnoczky et al., 1994). ГТФ необходим для полимеризации тубулина (Timasheff, Grisham, 1980) и контролирует организацию цитоскелета через семейство Rho малых G-белков (Paterson

et al., 1990). ГТФ может действовать посредством G-белков, которые контролируют взаимодействие между мембранами (Takai et al., 1992), во взаимодействии участвует цитоскелет. Тот факт, что каждый из этих компонентов модулируется гормоном или ростовыми факторами (Downey et al., 1991; Ridley, Hall, 1992), позволяет предполагать возможность того, что коммуникация между внутриклеточными депо детерминирует внутриклеточную регуляцию. В наших исследованиях на основе ингибиторного анализа мы попытались охарактеризовать пути сигнальной трансдукции при воздействии рекомбинантного бычьего соматотропного гормона (СТГ) в ооцитах свиней на стадии диплотены. Выбор гормона основывали на полученных нами ранее данных о стимулирующем эффекте СТГ на ядерно-цитоплазматическое созревание ооцитов *in vitro* (Kuzmina et al., 2007).

В литературе представлены результаты исследований, свидетельствующие о том, что витрификация не влияет на структуру эндоплазматического ретикула в ооцитах на стадии зародышевого пузырька (стадии GV) (Lowther et al. 2009). В то же время в результате заморозки ооцитов нарушается способность эндоплазматического ретикула к реорганизации в процессе созревания женских гамет, что может вызывать снижение компетентности ооцитов к развитию (Kubota et al., 1998). Имеются также данные о торможении процесса реорганизации эндоплазматического ретикула при созревании ооцитов, девитрифицированных до реинициации мейоза на стадии диплотены (Diez et al., 2005).

Криорезистентность ооцита — важная проблема криобиологии, решение которой зависит от многих факторов, детерминирующих криотолерантность клетки. Различные элементы цитоскелета, в частности микротрубочки и микрофиламенты, участвуют в регуляции освобождения Ca^{2+} из внутриклеточных депо (Ribeiro et al., 1997; Baumann, 2001). На животных разных видов было показано, что витрификация приводит к разрушению микрофиламентов и не затрагивает микротрубочки (Albarracin et al., 2005; FitzHarris et al., 2007).

Цель настоящей работы — с помощью ингибиторного анализа исследовать флуктуацию содержания ионов кальция во внутриклеточных депо нативных и девитрифицированных ооцитов свиней при воздействии СТГ и ГТФ.

Материал и методика

В экспериментах использовали яичники свиней на стадии фолликулярного роста, без видимой патологии. Ооцит-кумуляусные комплексы выделяли из антральных фолликулов диаметром 3—6 мм, с широко разветвленной сетью капилляров, с высоким тургором, прозрачной оболочкой. В исследованиях использовали ооциты округлой формы с тонкогранулированной ооплазмой, с равномерной по ширине зоной пеллюцида и окруженные пятью и более слоями клеток кумулюса.

Инкубацию выделенных ооцитов проводили в модифицированной инкубационной среде Дюльбекко, содержащей 36 мкг/мл пирувата Na и 1 мг/мл глюкозы в отсутствие CaCl_2 . Ооциты, предназначенные для витрификации, обрабатывали тремя растворами криопротекторов (CPA), приготовленных на среде TC-199 (Sigma, США), содержащей 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (Sigma, США). Состав CPA-1: 0.7 М диметилсульфоксида (ДМСО) и 0.9 М этиленгликоля (ЭГ); CPA-2: 1.4 М ДМСО и 1.8 М ЭГ; CPA-3: 2.8 М ДМСО, 3.6 М ЭГ и 0.65 М трегалозы. Ооциты поэтапно помещали на 30 с в CPA-1, потом в CPA-2 и, наконец, в CPA-3 на 20 с. Соломины с ооцитами опускали в жидкий азот. Витрифицированные ооциты находились в жидком азоте не менее 1 ч. Для девитрификации ооциты извлекали из соломин и помещали в 3 мл 0.25 М трегалозы в среде TC-199, содержащей 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (Sigma, США), отмывали последовательно в растворе трегалозы сначала 0.19 М, затем 0.125 М при 38 °С и завершали отмывку средой TC-199 того же состава.

Концентрацию кальция во внутриклеточных депо ооцитов свиней измеряли с помощью флуоресцентного зонда хлортетрациклина (ХТЦ; Sigma, США). Перед проведением измерений ооциты очищали от клеток кумулюса. Ооциты инкубировали в течение 5 мин при 38 °С в инкубационной среде, содержащей 20 мкМ ХТЦ. После этого нагруженные клетки 3 раза отмывали в инкубационной среде и переносили на специальное кварцевое стекло с ячейками объемом 0.05 мл. Измерение Ca^{2+} в ооцитах производили в среде Дюльбекко.

Интенсивность флуоресценции ХТЦ (в усл. ед.) в ооцитах измеряли с помощью флуориметрической установки, состоящей из люминесцентного микроскопа, снабженного ртутной лампой постоянного тока ДРШ-250-3, необходимыми светофильтрами и фотометрической насадкой ФМЭЛ-1А. Спектр возбуждения комплекса ХТЦ— Ca^{2+} — мембрана находился в области 380—400 нм, максимум флуоресценции регистрировали в обла-

сти 530 нм. Длительность возбуждения флуоресценции не превышала 5 с.

В работе использовали инкубационную среду Дюльбекко, не содержащую CaCl_2 , ингибитор протеинкиназы С Ro 31-8220, ГТФ, ГТФ γ S, нокодазол, ХТЦ, ЭГТА (Sigma, США) и СТГ (Monsanto, США). Ro 31-8220 и нокодазол растворяли в ДМСО, остальные реактивы разводили в среде Дюльбекко. Во всех экспериментах в среду инкубации добавляли ЭГТА в концентрации 0.5 мМ.

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

Результаты

На рис. 1 представлены результаты влияния ингибитора протеинкиназы С на активированное СТГ и ГТФ освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо интактных и девитрифицированных ооцитов свиней. Добавление СТГ в концентрации 10 нг/мл или ГТФ в концентрации 10 мкМ вызывает освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо нативных ооцитов (рис. 1, а). Ранее в наших исследованиях было показано, что ХТЦ способствует проникновению ГТФ в ооциты свиней (Денисенко, Кузьмина, 2005). При совместном действии СТГ и ГТФ в таких ооцитах отмечали дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Внесение в среду инкубации с ооцитами ингибитора протеинкиназы С соединения Ro 31-8220 (10 нг/мл) приводило к освобождению Ca^{2+} из внутриклеточных депо. После обработки интактных ооцитов ингибитором протеинкиназы С добавление СТГ или ГТФ стимулировало освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Однако при совместном действии СТГ и ГТФ в присутствии ингибитора протеинкиназы С не отмечали дополнительного освобождения Ca^{2+} из внутриклеточных депо в отличие от действия СТГ и ГТФ в контрольных клетках.

В девитрифицированных ооцитах отмечали снижение количества мембрано-связанного кальция. Внесение в среду инкубации СТГ или ГТФ вызывало в них освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо (рис. 1, б). Совместное действие СТГ и ГТФ в девитрифицированных ооцитах, так же как и в нативных, стимулировало дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Если в нативных ооцитах ингибитор протеинкиназы С стимулировал выход Ca^{2+} из внутриклеточных депо, то в ооцитах после размораживания добавление ингибитора протеинкиназы С приводило к снижению освобождения Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Добавление СТГ или ГТФ к обработанному ингибитором протеинкиназы С ооцитам стимулировало освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо. И так же, как в интактных клетках, совместное действие СТГ и ГТФ не активировало дополнительного освобождения Ca^{2+} из внутриклеточных депо девитрифицированных ооцитов, предварительно обработанных ингибитором протеинкиназы С.

Данные о влиянии ингибитора полимеризации микротрубочек нокодазола на стимулированное СТГ и ГТФ освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо ооцитов свиней представлены на рис. 2. Для предотвращения полимеризации микротрубочек использовали нокодазол в концентрации 10 мкМ. Воздействие СТГ в концентрации 10 нг/мл или ГТФ в концентрации 10 мкМ активировало освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо нативных

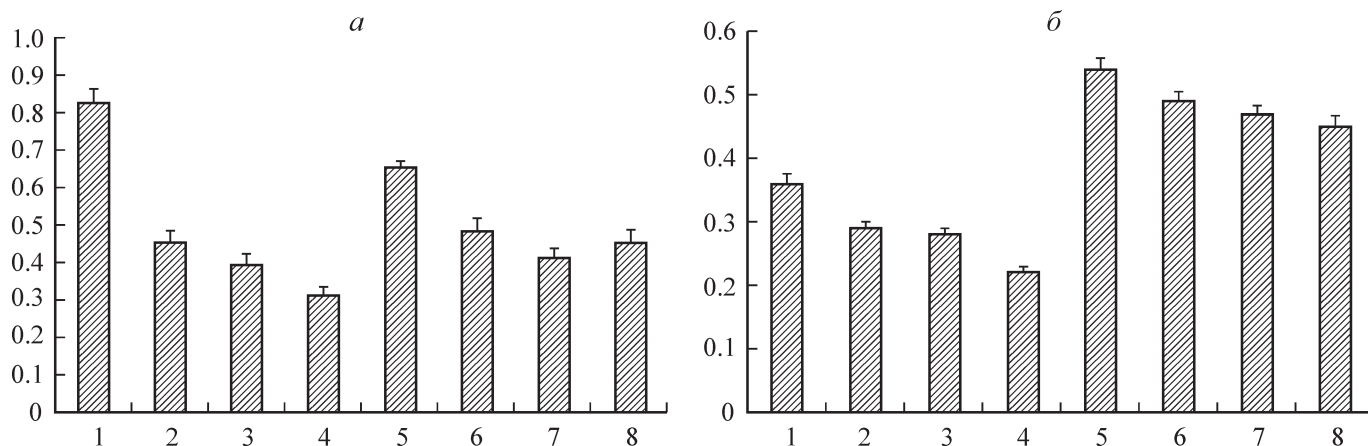


Рис. 1. Влияние ингибитора протеинкиназы С (Ro 31-8220) на освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо нативных (а) и девитрифицированных (б) ооцитов свиньи, стимулированных СТГ и ГТФ.

По вертикали — интенсивность флуоресценции ХТЦ, усл. ед.; по горизонтали: 1 — контрольные клетки; 2 — активация СТГ, 10 нг/мл; 3 — 10 мкМ ГТФ; 4 — СТГ и ГТФ совместно; 5 — 10 нг/мл Ro; 6 — Ro с последующей обработкой СТГ; 7 — Ro с последующей обработкой ГТФ; 8 — Ro и последующее совместное действие СТГ и ГТФ. а: различия достоверны при $P < 0.001$ (между столбиками 1 и 2, 1 и 3, 2 и 4, 1 и 5), $P < 0.01$ (4 и 8) и $P < 0.05$ (3 и 4); б: различия достоверны при $P < 0.001$ (между столбиками 1 и 2, 1 и 3, 2 и 4, 3 и 4, 1 и 5, 4 и 8). Здесь и далее представлены изменения Ca^{2+} , полученные в 4—5 экспериментах.

ооцитов (рис. 2, а). Их совместное действие стимулировало в таких ооцитах дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Обработка ооцитов нокодазолом не оказывала влияния на уровень содержания кальция во внутриклеточных депо. Добавление СТГ или ГТФ к обработанным нокодазолом ооцитам стимулировало освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Однако совместное действие СТГ и ГТФ в обработанных нокодазолом ооцитах не активировало дополнительного освобождения Ca^{2+} из внутриклеточных депо.

В ооцитах, подвергшихся процедуре витрификации, после размораживания СТГ или ГТФ стимулировали освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо (рис. 2, б). Совместное действие СТГ и ГТФ в девитрифицированных ооцитах активировало дополнительный выход Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Внесение в среду инкубации с девитрифицированными ооцитами нокодазола не оказывало влияния на освобождение Ca^{2+} из внутриклеточ-

ных депо. Также не влиял нокодазол и на стимулированный СТГ или ГТФ выход Ca^{2+} из внутриклеточных депо, а дополнительного освобождения Ca^{2+} при совместном действии СТГ и ГТФ в присутствии нокодазола не отмечали.

Данные экспериментов по влиянию негидролизуемого аналога ГТФ на освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо ооцитов свиней представлены на рис. 3. Добавление СТГ или ГТФ в концентрациях соответственно 10 нг/мл и 10 мкМ стимулировало в ооцитах освобождение Ca^{2+} из депо. Совместное действие СТГ и ГТФ вызывало дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Использование ГТФ γ S в концентрации 10 мкМ не приводило к выходу Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Также не отмечали освобождения Ca^{2+} при совместном действии ГТФ в концентрации 10 мкМ и ГТФ γ S в концентрации 100 мкМ, а добавление ГТФ γ S в концентрации 100 мкМ не оказывало влияния на дополнительное освобождение Ca^{2+} , стимулированное совместным действием СТГ и ГТФ.

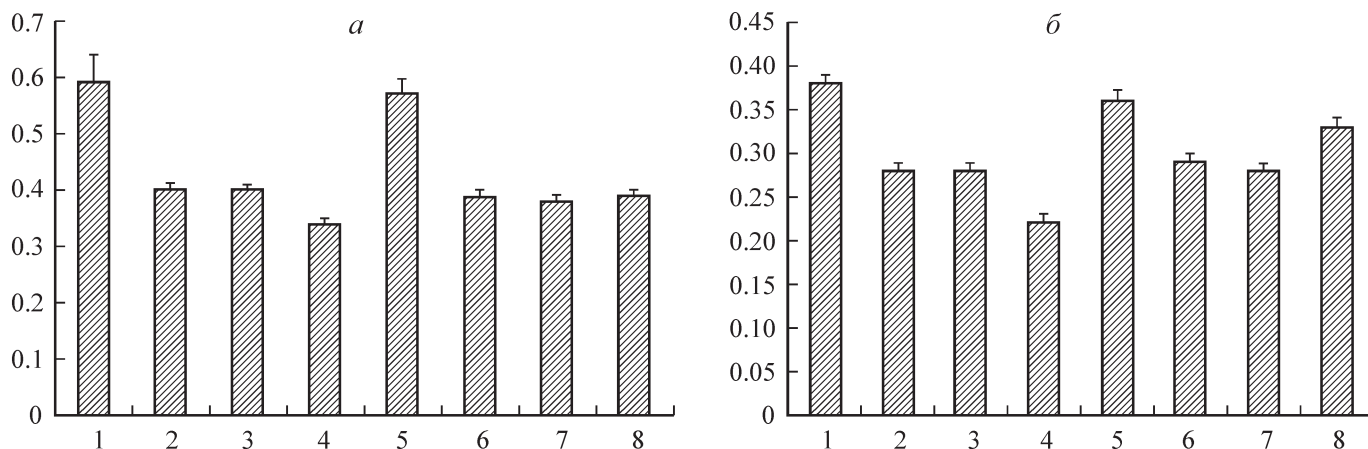


Рис. 2. Влияние ингибитора полимеризации микротрубочек (нокодазола) на освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо нативных (а) и девитрифицированных (б) ооцитов свиньи, стимулированных СТГ и ГТФ.

По вертикали — интенсивность флуоресценции ХТЦ, усл. ед.; по горизонтали: 1 — контрольные клетки; 2 — активация СТГ, 10 нг/мл; 3 — 10 мкМ ГТФ; 4 — совместное действие СТГ и ГТФ; 5 — 10 мкМ нокодазола; 6 — нокодазол с последующей обработкой СТГ; 7 — нокодазол с последующей обработкой ГТФ; 8 — нокодазол и последующее совместное действие СТГ и ГТФ. а: различия достоверны при $P < 0.001$ (между столбиками 1 и 2, 2 и 4, 3 и 4), $P < 0.01$ (4 и 8); б: различия достоверны при $P < 0.001$ (между столбиками 1 и 2, 1 и 3, 2 и 4, 3 и 4, 4 и 8).

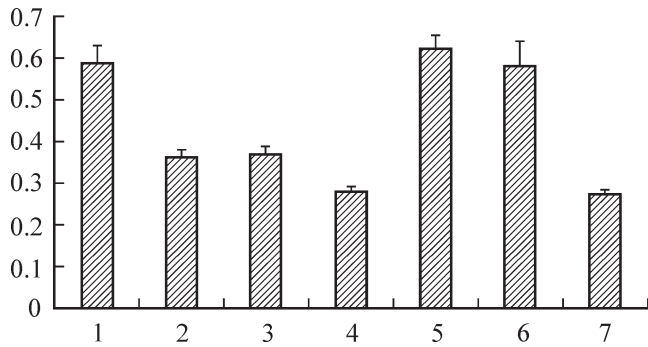


Рис. 3. Влияние негидролизующего аналога ГТФ (ГТФ γ S) на освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо ооцитов свиньи.

По вертикали — интенсивность флуоресценции ХТЦ, усл. ед.; по горизонтали: 1 — контрольные клетки; 2 — активация СТГ, 10 нг/мл; 3 — 10 мкМ ГТФ; 4 — совместное действие СТГ и ГТФ; 5 — 10 мкМ ГТФ γ S; 6 — совместное действие ГТФ и 100 мкМ ГТФ γ S; 7 — действие СТГ с последующей обработкой ГТФ и 100 мкМ ГТФ γ S. Различия достоверны при $P < 0.001$ (между столбиками 1 и 2, 1 и 3, 2 и 4, 3 и 4).

Обсуждение

Известно, что ГТФ опосредует процесс образования связи между двумя внутриклеточными депо — рианодин- и IP_3 -чувствительными — и обеспечивает переход Ca^{2+} из рианодин- в IP_3 -чувствительные внутриклеточные депо (Mullaney et al., 1987). При совместном действии ГТФ и IP_3 в клетках отмечается дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо, что свидетельствует о перемещении Ca^{2+} между различными внутриклеточными депо (Mullaney et al., 1987; Ghosh et al., 1989).

Ранее показано, что СТГ и ГТФ освобождают Ca^{2+} из различных внутриклеточных депо ооцитов свиньи: СТГ стимулирует освобождение Ca^{2+} из IP_3 -чувствительных внутриклеточных депо, а ГТФ — из рианодин-чувствительных (Денисенко, Кузьмина, 2010). Результаты представленного исследования выявили, что совместное действие СТГ и ГТФ активирует дополнительный выход Ca^{2+} из внутриклеточных депо ооцитов. Этот дополнительный выход Ca^{2+} регулируется протеинкиназой С, в присутствии ингибитора протеинкиназы С дополнительное освобождение Ca^{2+} отсутствовало. ГТФ образует связь с цитоскелетом, участвуя в синтезе микротрубочек (Timasheff, Grisham, 1980; Najnoczky et al., 1994). Обнаружено, что нокадазол не оказывал влияния на освобождение Ca^{2+} в ооцитах, стимулированное отдельно СТГ или ГТФ, и ингибировал дополнительный выход Ca^{2+} , стимулированный совместным действием СТГ и ГТФ. Согласно полученным результатам, переход Ca^{2+} между рианодин- и IP_3 -чувствительными внутриклеточными депо регулируется не только протеинкиназой С, в процесс перемещения Ca^{2+} между внутриклеточными депо вовлекаются микротрубочки.

Кроме опосредующей роли ГТФ в образовании связи между внутриклеточными депо нуклеотид способен сам стимулировать освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Анализируя данные о действии одного ГТФ и его совместном действии с СТГ, можно предположить, что механизм действия ГТФ в этих случаях различный. Рядом авторов было показано, что освобождение Ca^{2+} ГТФ связано с гидролизом ферментами терминального фосфата ГТФ (Gill et al., 1986; Ueda et al., 1986). Использование негидролизующего аналога ГТФ (ГТФ γ S) в следующей се-

рии проведенных нами экспериментов предполагало выявление возможных различий в механизмах действия ГТФ при освобождении Ca^{2+} из внутриклеточных депо и образовании связи между внутриклеточными депо, т. е. если гидролиз ГТФ необходим для освобождения Ca^{2+} , то необходим ли он и для образования связи между различными внутриклеточными депо?

Обнаружено, что в присутствии негидролизующего аналога ГТФ γ S в ооцитах свиньи ингибируется освобождение Ca^{2+} , стимулируемое отдельно ГТФ. В то же время в присутствии негидролизующего аналога ГТФ γ S наблюдается дополнительное освобождение Ca^{2+} , стимулируемое совместным действием СТГ и ГТФ. Логично предположить, что влияние ГТФ на освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо и образование связи между различными внутриклеточными депо с помощью ГТФ детерминируется различными механизмами. Стимулированное ГТФ освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо опосредуется гидролизом терминального остатка ГТФ, связывание различных внутриклеточных депо с помощью ГТФ не зависит от гидролиза ГТФ.

Витрификация ооцитов оказывает неоднозначный эффект на элементы цитоскелета. На животных различных видов было показано, что витрификация приводит к разрушению микрофиламентов и не затрагивает микротрубочек (Albarracin et al., 2005; FitzHarris et al., 2007). На ооцитах свиньи было продемонстрировано, что замораживание не влияет на сохранность микротрубочек, в то же время вызывает деструкцию микрофиламентов (Rojas et al., 2004; Wu et al., 2006). В наших экспериментах подтверждено, что в девитрифицированных ооцитах совместное действие СТГ и ГТФ стимулировало дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо. После воздействия на такие ооциты нокадазола исчезало дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо при совместном действии СТГ и ГТФ.

Из анализа данных наших экспериментов следует заключить, что структура эндоплазматического ретикула, являющегося основным внутриклеточным резервуаром кальция, при витрификации ооцитов на стадии GV не повреждается. Есть данные о возможности завершения мейоза в девитрифицированных ооцитах на стадии-GV (Lowther et al., 2009). Авторы этой работы показали, что после созревания *in vitro* такие ооциты способны к освобождению Ca^{2+} в ответ на воздействие IP_3 и компетентны к оплодотворению. Полученные нами результаты и анализ данных литературы позволяют предположить, что деструкция микрофиламентов в результате витрификации не оказывает значительного влияния на дальнейшее созревание девитрифицированных ооцитов. Во взаимодействии различных внутриклеточных депо ооцитов вовлекаются протеинкиназа С и микротрубочки. После девитрификации пути сигнальной трансдукции в ооцитах не претерпевали изменений.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект офи-а 10-04-00389).

Список литературы

Денисенко В. Ю., Кузьмина Т. И. 2005. Эффект гуаниновых нуклеотидов и протеинкиназы С на стимулированное пролактином освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо ооцитов свиньи. Онтогенез. 36 (3) : 1—6.

- Денисенко В. Ю., Кузьмина Т. И. 2010. Влияние ингибитора IP₃-чувствительных рецепторов на стимулированное соматотропином освобождение Ca²⁺ из внутриклеточных депо ооцитов свиней. В кн.: Международная научно-практическая конференция «Биологические ресурсы». Киров. 56—57.
- Albarracin J. L., Morato R., Rojas C., Mogas T. 2005. Effects of vitrification in open pulled straws on the cytology of *in vitro* matured prepubertal and adult bovine oocytes. *Theriogen*. 63 : 890—901.
- Clapham D. E. 1995. Calcium signaling. *Cell*. 80 : 259—268.
- Diez C., Duque P., Gomez E., Hidalgo C. O., Tamargo C., Rodriguez A., Fernandez L., de la Varga S., Fernandez A., Facal N., Carbajo M. 2005. Bovine oocyte vitrification before or after meiotic arrest: effects on ultrastructure and developmental ability. *Theriogen*. 64 : 317—333.
- Downey G. P., Elson E. L., Schwab B., Erzurum S. G., Young S. K., Worthen G. S. 1991. Biophysical properties and microfilament assembly in neutrophils: modulation by cyclic AMP. *J. Cell Biol.* 114 : 1179—1190.
- FitzHarris G., Marangos P., Carroll J. 2007. Changes in endoplasmic reticulum structure during mouse oocyte maturation are controlled by the cytoskeleton and cytoplasmic dynein. *Develop. Biol.* 305 : 133—144.
- Ghosh T. K., Mullaney J. M., Tarazy F. I., Gill D. L. 1989. GTP-activated communication between distinct inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive and -insensitive calcium pools. *Nature*. 340 : 236—239.
- Gill D. L., Ueda T., Chueh S. H., Noel M. W. 1986. Ca²⁺ release from endoplasmic reticulum is mediated by a guanosine nucleotide regulatory mechanism. *Nature*. 320 : 461—464.
- Hajnoczky G., Lin C., Thomas A. 1994. Luminal communication between intracellular calcium stores modulated by GTP and the cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 269 : 10 280—10 287.
- Kubota C., Yang X., Dinnyes A., Todoroki J., Yamakuchi H., Mizoshita K., Inohae S., Tabara N. 1998. *In vitro* and *in vivo* survival of frozen-thawed bovine oocytes after IVF, nuclear transfer, and parthenogenetic activation. *Mol. Reprod. Develop.* 51 : 281—286.
- Kuzmina T., Alm H., Denisenko V., Tuchscher A., Kanitz W., Torner H. 2007. Effect of recombinant bovine somatotropin (rbST) on cytoplasmic maturation of bovine oocytes and their developmental competence *in vitro*. *J. Reprod. Develop.* 53 : 2309—2316.
- Lowther K., Weitzman V., Maier D., Mehlmann L. 2009. Maturation, fertilization, and the structure and function of the endoplasmic reticulum in cryopreserved mouse oocytes. *Biol. Reprod.* 81 : 147—154.
- Machaty Z., Funahashi H., Day B. N., Prather R. S. 1997. Developmental changes in the intracellular Ca²⁺ release mechanisms in porcine oocytes. *Biol. Reprod.* 56 : 921—930.
- Malcuit C., Kurokawa M., Fissore R. A. 2006. Calcium oscillations and mammalian egg activation. *J. Cell. Physiol.* 206 : 565—573.
- Men H., Monson R. L., Rutledge J. J. 2002. Effect of meiotic stages and maturation protocols on bovine oocyte's resistance to cryopreservation. *Theriogen*. 57 : 1095—1103.
- Mullaney J. M., Chueh S. H., Ghosh T. K., 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.
- Paterson H. F., Self A. J., Garrett M. D., Just I., Aktories K., Hall A. 1990. Microinjection of recombinant p21rho induces rapid changes in cell morphology. *J. Cell Biol.* 111 : 1001—1007.
- Ridley A. J., Hall A. 1992. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*. 70 : 389—399.
- Rojas C., Palomo M. J., Albarracin J. L., Mogas T. 2004. Vitrification of immature and *in vitro* matured pig oocytes: study of distribution of chromosomes, microtubules, and actin microfilaments. *Cryobiology*. 49 : 211—220.
- Takai Y., Kaihuchi K., Kikuchi A., Kawata M. 1992. Small GTP-binding proteins. *Int. Rev. Cytol.* 133 : 187—230.
- 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.
- Timasheff S. N., Grisham L. M. 1980. *In vitro* assembly of cytoplasmic microtubules. *Annu. Rev. Biochem.* 49 : 565—591.
- Ueda T., Chueh S. H., Noel M. W. 1986. Influence of inositol 1,4,5-trisphosphate and guanine nucleotides on intracellular calcium release within the N1E—115 neuronal cell line. *J. Biol. Chem.* 261 : 3184—3192.
- Wu C., Rui R., Dai J., Zhang C., Ju S., Xie B., Lu X., Zheng X. 2006. Effects of cryopreservation on the developmental competence, ultrastructure and cytoskeletal structure of porcine oocytes. *Mol. Reprod. Develop.* 73 : 1454—1462.
- Yue C., White K. I., 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.

Поступила 7 XI 2011

IDENTIFICATION OF SIGNAL TRANSDUCTION PATHWAY IN FRESH AND VITRIFIED PORCINE OOCYTES

V. Yu. Denisenko, T. I. Kuzmina

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

Signal transduction pathway under the influence of somatotropin have been identified basis on the analysis of Ca²⁺ release from intracellular stores of fresh and vitrified porcine oocytes using inhibitory analysis. Somatotropin and GTP individually stimulated Ca²⁺ release from intracellular stores. The joint action of somatotropin and GTP activated additional Ca²⁺ release from intracellular stores both in fresh and vitrified porcine oocytes. Treatment of the oocytes with inhibitor of protein kinase C caused no additional Ca²⁺ release from intracellular stores. Ca²⁺ release from intracellular stores stimulated by GTP was connected with phosphate hydrolysis. Moving between intracellular Ca²⁺ depots stimulated by GTP was not determined by phosphate hydrolysis. Inhibitor of protein kinase C and microtubules were involved in the interaction of various intracellular depots. The data obtained suggest that signal transduction pathway in porcine oocytes do not change after vitrification.

Key words: calcium, oocytes, pig, vitrification.