

ИДЕНТИФИКАЦИЯ МЕХАНИЗМОВ КАЛЬЦИЕВОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЭСТРАДИОЛА НА ООЦИТЫ СВИНЕЙ, СТИМУЛИРОВАННЫЕ СОМАТОТРОПИНОМ И ТЕОФИЛЛИНОМ

© В. Ю. Денисенко, Т. И. Кузьмина¹

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

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

На основе использования ингибиторного анализа с помощью флуоресцентного зонда хлортетрациклина исследовали влияние эстрадиола на мобилизацию Ca^{2+} из внутриклеточных депо ооцитов свиней, стимулированную соматотропным гормоном (СТГ) и теофиллином. Показано, что как СТГ, так и теофиллин стимулируют мобилизацию Ca^{2+} из внутриклеточных депо в контрольных ооцитах, тогда как совместное их действие не приводит к дополнительному выходу Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Ингибитор протеинкиназы С не влиял на освобождение Ca^{2+} , стимулированное СТГ или теофиллином. В обработанных эстрадиолом ооцитах только совместное воздействие соматотропина и теофиллина стимулирует освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо, и это освобождение Ca^{2+} снижается в присутствии ингибитора протеинкиназы С. При действии эстрадиола ингибитор полимеризации микротрубочек нокодазол блокирует освобождение Ca^{2+} при совместном действии СТГ и теофиллина. Инкубация ооцитов в среде с АДФ и последующее добавление ГДФ ингибировали освобождение Ca^{2+} , стимулированное совместным действием СТГ и теофиллина. Полученные данные свидетельствуют о вовлечении эстрадиола в механизмы кальциевой сигнализации в ооцитах свиней.

Ключевые слова: эстрадиол, соматотропин, теофиллин, кальций, ооциты свиньи.

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

Стероидный гормон эстрадиол синтезируется клетками гранулезы и активно вовлекается в созревание женской гаметы, при его воздействии на клетку отмечается флуктуация содержания мембранно-связанного кальция. В некоторых клетках эстрадиол увеличивает концентрацию цитозольного кальция за счет образования инозитол-1,4,5-трифосфата (IP_3) и освобождения Ca^{2+} из внутриклеточных депо (Morley et al., 1992; Picotto et al., 1999).

Известно, что соматотропный гормон (СТГ) вовлекается в регуляцию механизмов роста, дифференцировки и ряда других функций организма млекопитающих. Воздействие СТГ на клетки активирует целый ряд сигнальных механизмов. Показано, что в адипоцитах и гепатоцитах крысы СТГ вызывает вход внеклеточного Ca^{2+} в клетку (Gaur et al., 1996; Margero et al., 1996). В других клетках СТГ стимулирует образование вторичных посредников — IP_3 и диацилглицерина (Carter-Su et al., 1996; Campbell, 1997). IP_3 в клетках вызывает активацию внутриклеточных рецепторов, и это приводит к освобождению Ca^{2+} из внутриклеточных депо (Berridge, 2002).

Добавление теофиллина к клеткам различного типа вызывает увеличение внутриклеточной концентрации цАМФ (Досон и др., 1991), который вовлекается в гомеостазис внутриклеточного кальция в клетках. Так, в клетках слонных желез крыс цАМФ вызывает освобождение

Ca^{2+} из внутриклеточных депо при активации IP_3 -рецепторов (Zhang, Martinez, 1999), а в пермеабилizованных клетках околушных желез крыс стимулированное цАМФ освобождение Ca^{2+} происходит при активации рיאнодинных рецепторов (Rubin, Adolf, 1994).

Цель работы заключалась в идентификации механизмов кальциевой сигнализации при воздействии эстрадиола на стимулированное СТГ и теофиллином освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо ооцитов свиней.

Материал и методика

Для экспериментов получали яичники от половозрелых свинок (6—8 мес) породы ландрас, забитых на мясокомбинате. Ооцит-кумуляные комплексы выделяли из яичников на стадии фолликулярного роста без признаков видимой патологии аспирацией фолликулов диаметром 3—6 мм. Использовали ооциты округлой формы с тонкогранулированной оплазмой и равномерной по ширине зоной пеллюциды. Выделенные ооциты инкубировали в модифицированной инкубационной среде Дюльбекко, содержащей 36 мг/л пирувата Na и 1 г/л глюкозы, но не содержащей CaCl_2 .

Уровень содержания кальция во внутриклеточных депо ооцитов свиней измеряли с помощью флуоресцент-

ного зонда хлортетрациклина (ХТЦ). Ооциты экспонировали в течение 5 мин при 37 °С в среде, содержащей 40 мкМ ХТЦ. Затем клетки 3 раза отмывали в инкубационной среде и переносили на специальное кварцевое стекло с ячейками объемом 0.05 мл. Зависимую от Ca^{2+} флуоресценцию ХТЦ регистрировали в ооцитах в среде Дюльбекко.

Интенсивность флуоресценции ХТЦ измеряли на флуориметрической установке, состоящей из люминесцентного микроскопа, снабженного необходимыми светофильтрами и фотометрической насадкой ФМЭЛ-1А. Комплекс ХТЦ— Ca^{2+} —мембрана возбуждали светом с длиной волны 380—400 нм, флуоресценцию регистрировали в области 530 нм. Интенсивность флуоресценции измеряли в усл. ед. Длительность воздействия ультрафиолетового излучения на ооциты при проведении измерений не превышала 5 с.

В работе использовали следующие вещества: инкубационную среду Дюльбекко, не содержащую CaCl_2 , ингибитор протеинкиназы С Ro 31-8220, теофиллин, эстрадиол, АДФ, ГДФ, ингибитор полимеризации микротрубочек нокодазол (Sigma, США), ХТЦ (ICN, США) и СТГ (Monsanto, США). Ro 31-8220 и нокодазол растворяли в диметилсульфоксиде, эстрадиол — в этиловом спирте, остальные реактивы разводили в среде Дюльбекко. Во всех экспериментах в среду инкубации добавляли 0.5 мМ ЭГТА.

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

Результаты

Для инкубации ооцитов во всех экспериментах использовали инкубационную среду Дюльбекко без добавления внеклеточного кальция. Влияние ингибитора протеинкиназы С (Ro 31-8220) в концентрации 10 нг/мл на стимулированное СТГ и теофиллином освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо ооцитов свиней показано на рис. 1, а. Концентрации используемых в экспериментах СТГ и теофиллина составляли 10 нг/мл и 10 мМ соответственно. Добавление СТГ или теофиллина стимулировало в ооцитах освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Совместное действие СТГ и теофиллина не приводило к дополнительному освобождению Ca^{2+} из внутриклеточных депо.

Обработка ооцитов ингибитором протеинкиназы С вызывала в клетках выход Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Добавление к обработанным ингибитором протеинкиназы С ооцитам СТГ или теофиллина, а также их совместное действие не приводило к изменению интенсивности флуоресценции, которое отличалось бы от действия этих соединений в клетках, не обработанных Ro 31-8220.

Результаты влияния 1 мкг/мл эстрадиола на стимулированное СТГ и теофиллином освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо ооцитов свиней представлены на рис. 1, б. Ни СТГ в концентрации 10 нг/мл, ни теофиллин в концентрации 10 мМ в обработанных эстрадиолом ооцитах не стимулировали освобождение Ca^{2+} . Однако совместно добавленные СТГ и теофиллин в ооцитах вызывали выход Ca^{2+} из депо. После обработки ооцитов ингибитором протеинкиназы С в концентрации 10 нг/мл в клетках не изменялась интенсивность флуоресценции. Последующее добавление к таким ооцитам СТГ или теофиллина, а также их совместное действие на клетки, об-

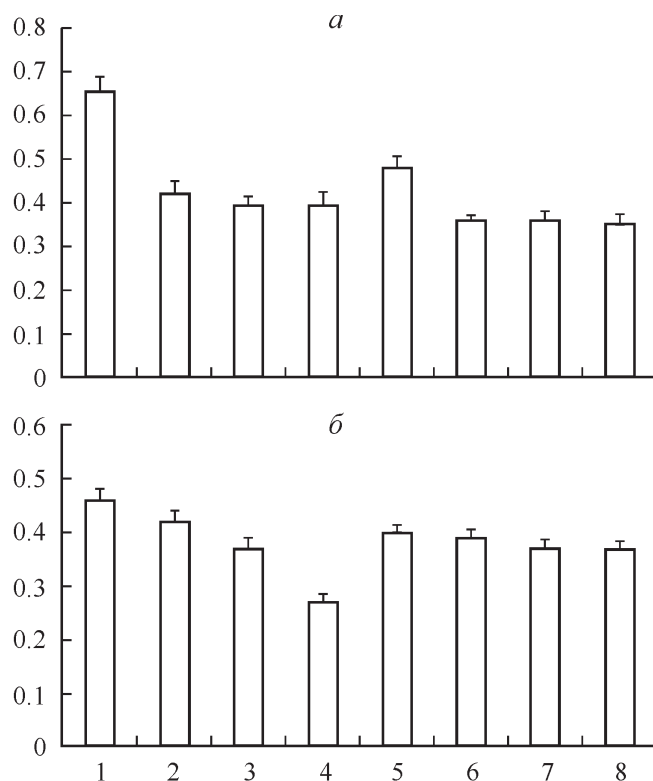


Рис. 1. Влияние ингибитора протеинкиназы С (а) и эстрадиола (б) на стимулированное соматотропином (СТГ) и теофиллином освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо ооцитов свиней.

По горизонтали: 1 — контроль (необработанные ооциты); 2 — СТГ, 10 нг/мл; 3 — теофиллин, 10 мМ; 4 — СТГ и теофиллин совместно; 5 — Ro 31-8220, 10 нг/мл; 6 — Ro 31-8220 с последующей обработкой СТГ; 7 — Ro 31-8220 с последующей обработкой теофиллином; 8 — Ro 31-8220 и последующее совместное действие СТГ и теофиллина. По вертикали — интенсивность флуоресценции зонда ХТЦ, усл. ед. а: различия достоверны при $P < 0.001$ (между 1 и 2, 1 и 3), $P < 0.01$ (между 1 и 5); б: различия достоверны при $P < 0.001$ (между 2 и 4, 3 и 4, 4 и 8), $P < 0.01$ (между 1 и 3). Здесь и далее представлены изменения Ca^{2+} , полученные в 4—5 экспериментах.

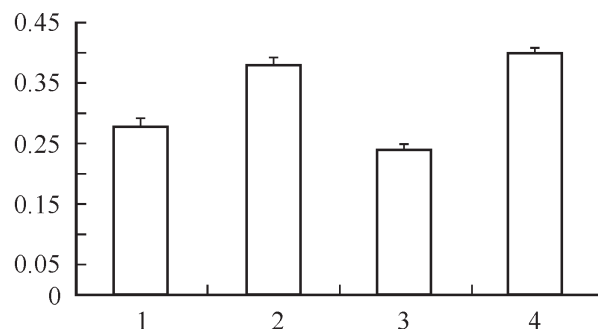


Рис. 2. Влияние ингибитора полимеризации микротрубочек нокодазола и АДФ на стимулированное соматотропином (СТГ) и теофиллином освобождение Ca^{2+} из депо ооцитов свиней, обработанных эстрадиолом.

По горизонтали: 1 — ооциты, обработанные 10 нг/мл СТГ и 10 мМ теофиллина совместно; 2 — обработка нокодазолом и последующее совместное действие СТГ и теофиллина; 3 — обработка АДФ и последующее совместное действие СТГ и теофиллина; 4 — обработка АДФ и ГДФ и последующее совместное действие СТГ и теофиллина. По вертикали — интенсивность флуоресценции ХТЦ, усл. ед. Различия достоверны при $P < 0.001$ (между 1 и 2, 3 и 4).

работанные ингибитором протеинкиназы С, не стимулировали освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо.

На рис. 2 показано влияние ингибитора полимеризации микротрубочек нокодазола и АДФ на стимулированное совместным действием СТГ и теофиллина освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо ооцитов. Все ооциты в данном эксперименте обрабатывали эстрадиолом (1 мкг/мл). Добавление 10 мкМ нокодазола ингибировало освобождение Ca^{2+} , стимулированное совместным действием СТГ и теофиллина. Обработка ооцитов АДФ в концентрации 1 мМ не влияла на освобождение Ca^{2+} из депо, стимулированное совместным действием СТГ и теофиллина. В то же время совместная обработка ооцитов АДФ и ГДФ в концентрации 100 мкМ ингибировала выход Ca^{2+} из депо, активированный совместным действием СТГ и теофиллина.

Обсуждение

Согласно существующей гипотезе (Ghosh et al., 1989), при определенных условиях в клетке могут происходить образование связи и перемещение кальция между его различными внутриклеточными депо. Для образования связи между депо кальция в клетке необходимо, чтобы соединения стимулировали: 1) выход Ca^{2+} из депо вообще, 2) выход Ca^{2+} из различных внутриклеточных депо (рианодин- и IP_3 -чувствительных) и 3) дополнительный выход Ca^{2+} из внутриклеточных депо в случае совместного действия агентов.

В ооцитах свиней СТГ и теофиллин стимулируют освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо, причем СТГ вызывает освобождение Ca^{2+} из IP_3 -, а теофиллин — из ррианодин-чувствительных депо (Денисенко, Кузьмина, 2010). Однако при их совместном действии отсутствует дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Отсутствие дополнительного освобождения позволяет предположить, что используемые соединения — СТГ и теофиллин — не способны образовать связь между различными внутриклеточными депо кальция.

В организме эстрадиол способствует образованию связи между различными клетками, обеспечивая таким образом их коммуникацию (Di et al., 2001). Предполагается, что и внутри клетки эстрадиол вовлекается в образование связи между различными внутриклеточными структурами. При совместном действии СТГ и теофиллина в ооцитах свиней не образуется связь между различными (рианодин- и IP_3 -чувствительными) внутриклеточными депо кальция, так как отсутствует дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо. После обработки ооцитов эстрадиолом Ca^{2+} выходит из депо при совместном действии СТГ и теофиллина, что свидетельствует об образовании связи и переходе кальция между различными внутриклеточными депо.

Добавление эстрадиола в среду культивирования способствовало возрастанию количества созревших клеток и повышало качество созревших ооцитов (Dode, Graves, 2002). Мейотическое созревание ооцитов сопровождается мобилизацией Ca^{2+} из IP_3 -чувствительных внутриклеточных депо, так как при инъекции реагентов, ингибирующих образование IP_3 или его связывание с рецепторами, прекращается нормальное созревание яйцеклетки, в то время как добавление специфических ингибиторов ррианодин-чувствительных рецепторов не оказывает влияния на мейоз (Noh, Han, 1998; Santella et al., 1999). Увеличе-

ние количества созревших ооцитов при добавлении в среду культивирования эстрадиола, возможно, связано с тем, что в присутствии эстрадиола образуется связь между различными внутриклеточными депо и происходит переход Ca^{2+} из ррианодин- в IP_3 -чувствительные депо, из которых он потом освобождается во время прохождения стадий мейоза.

Сеть ЭР, который в клетке является основным внутриклеточным депо кальция, формируется в процессе слияния мембран везикул, в регуляцию которого вовлекаются различные цитозольные факторы (Berridge, 2002). In vitro показано, что формирование ЭР происходит независимо от функционального статуса микротрубочек путем контролируемой реакции синтеза (Dreier, Rapoport, 2000). Так как микротрубочки не участвуют в образовании новых везикул ЭР, предполагается, что эти структуры цитоскелета способны образовывать связи между сформированными элементами ЭР.

Для синтеза микротрубочек необходим ГТФ (Olmssted, Vorisy, 1975). На овариальных клетках китайского хомячка было показано, что эффект ГТФ выражается в слиянии мембран различных пузырьков ЭР. Добавление негидролизованного аналога ГТФ — ГТФ γ S — замедляет слияние мембран (Orsel et al., 1997). ГДФ может превращаться в ГТФ при действии фермента нуклеозиддифосфокиназа (Ueda et al., 1986). Превращение ГДФ в ГТФ блокируется добавлением АДФ, который более эффективно конкурирует с ГДФ при соединении с нуклеозиддифосфокиназой (Kimura, Shimada, 1983). Если в ооцитах свиней при совместном действии ГДФ и АДФ ингибируется освобождение Ca^{2+} , стимулированное совместным действием СТГ и теофиллина, то это означает, что в стимулированном эстрадиолом образовании связи между различными внутриклеточными депо участвует ГТФ. Из результатов экспериментов понятно, что использованные совместно ГДФ и АДФ оказывают негативное влияние на освобождение Ca^{2+} при совместной активации клеток СТГ и теофиллином. Кроме того, согласно нашим данным, в образовании связи между различными (рианодин- и IP_3 -чувствительными) внутриклеточными депо кальция участвует протеинкиназа С, так как в присутствии ее ингибитора отсутствует выход Ca^{2+} из депо, стимулированный совместным действием СТГ и теофиллина.

Таким образом, одной из возможных функций стероидных гормонов, в частности эстрадиола, является образование связи между различными внутриклеточными депо кальция и обеспечение перемещения Ca^{2+} между ними.

Список литературы

- Денисенко В. Ю., Кузьмина Т. И. 2010. Влияние ингибитора IP_3 -чувствительных рецепторов на стимулированное соматотропином освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо ооцитов свиней. В кн.: Международная научно-практическая конференция «Биологические ресурсы». Киров. 56—57.
- Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. 1991. Справочник биохимика. М.: Мир. 543 с.
- Berridge M. J. 2002. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. Cell Calcium. 32 : 235–249.
- Campbell G. S. 1997. Growth-hormone signal transduction. J. Pediatr. 131 : 42–44.
- Carter-Su C., Schwartz J., Smit L. S. 1996. Molecular mechanism of growth hormone action. Annu. Rev. Physiol. 58 : 187–207.
- Di W. L., Lachelin G. C., McGarrigle H. H., Thomas N. S., Becker D. L. 2001. Oestriol and oestradiol increase cell to cell

communication and connexin43 protein expression in human myometrium. *Mol. Hum. Reprod.* 7 : 671—679.

Dode M. A., Graves C. 2002. Involvement of steroid hormones on *in vitro* maturation of pig oocytes. *Theriogen.* 57 : 811—821.

Dreier L., Rapoport T. A. 2000. *In vitro* formation of the endoplasmic reticulum occurs independently of microtubules by a controlled fusion reaction. *J. Cell Biol.* 148 : 883—898.

Gaur S., Yamaguchi H., Goodman H. M. 1996. Growth hormone increases calcium uptake in rat fat cells by a mechanisms depends on protein kinase C. *Amer. J. Physiol.* 270 : 1485—1492.

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.

Kimura N., Shimada N. 1983. GDP does not mediate but rather inhibits hormonal signal to adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 258 : 2278—2283.

Marrero I., Green A. K., Cobbold P. H., Dixon C. J. 1996. Bovine growth hormone induced oscillations in cytosolic free Ca^{2+} in single rat hepatocytes. *Biochemistry.* 313 : 525—528.

Morley P., Whitfield J. F., Vanderhyden B. C., Tsang B. K., Schwartz J. L. 1992. A new, nongenomic estrogen action: the rapid release of intracellular calcium. *Endocrinology.* 131 : 1305—1312.

Noh S. I., Han J. K. 1998. Inhibition of the adenylyl cyclase and activation of the phosphatidylinositol pathway in oocytes through expressions of serotonin receptors does not induce oocyte maturation. *J. Exp. Zool.* 280 : 45—56.

Olmsted J. B., Borisy G. G. 1975. Ionic and nucleotide requirements for microtubule polymerization *in vitro*. *Biochemistry.* 14 : 2996—3005.

Orsel J. G., Bartoldus I., Stegmann T. 1997. Kinetics of fusion between endoplasmic reticulum vesicles *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 272 : 3369—3375.

Picotto G., Vazquez G., Boland R. 1999. 17beta-oestradiol increases intracellular Ca^{2+} concentration in rat enterocytes. Potential role of phospholipase C-dependent store-operated Ca^{2+} influx. *Biochem. J.* 339 : 71—77.

Rubin R. P., Adolf M. A. 1994. Cyclic AMP regulation of calcium mobilization and amylase release from isolated permeabilized rat parotid cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 268 : 600—606.

Santella I., De Riso I., Gragnaniello G., Kuozuka K. 1999. Cortical granule translocation during maturation of starfish oocytes requires cytoskeletal rearrangement triggered by $InsP_3$ -mediated Ca^{2+} release. *Exp. Cell Res.* 248 : 567—574.

Ueda T., Chueh S. H., Noel M. W., Gill D. L. 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.

Zhang G. H., Martinez J. R. 1999. Effects of forskolin, dibutyryl cAMP and H89 on Ca^{2+} mobilization in submandibular salivary cells of newborn rats. *Arch. Oral. Biol.* 44 : 735—744.

Поступила 15 V 2013

IDENTIFICATION OF MECHANISMS OF THE CALCIUM SIGNALING AT INFLUENCE OF ESTRADIOL ON PORCINE OOCYTES, STIMULATED BY THEOPHYLLIN AND SOMATOTROPIN

V. Yu. Denisenko, T. I. Kuzmina¹

All-Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding, St. Petersburg—Pushkin;

¹ e-mail: prof.kouzmina@mail.ru

Through the use of inhibitory analysis by using the fluorescent probe chlortetracycline examined the effects of estradiol on the mobilization of Ca^{2+} from intracellular stores of porcine oocytes stimulated by growth hormone and theophylline. It is shown that somatotropin or theophylline stimulates the mobilization of Ca^{2+} from intracellular stores of oocytes in control group, while their combined action does not lead to an additional exit of Ca^{2+} from intracellular stores. Inhibitor of protein kinase C had no effect on the release of Ca^{2+} — from oocyte stimulated by growth hormone or theophylline. In estradiol-treated oocytes, only the combined effects of growth hormone and theophylline stimulates the release of Ca^{2+} from intracellular stores, and that the release of Ca^{2+} is reduced by the use of an inhibitor of protein kinase C. In the presence of estradiol, an inhibitor of microtubule polymerization blocked the release of Ca^{2+} stimulated by the combined action of growth hormone and theophylline. Incubation of oocytes in the medium with the subsequent addition of ADP and GDP have an inhibitory effect on the release of Ca^{2+} from intracellular stores, stimulated joint action of growth hormone and theophylline. The findings suggest the involvement of estradiol in the mechanisms of calcium signaling in porcine oocytes.

Key words: estradiol, somatotropin, theophylline, calcium, pig oocytes.