

8. Милько, О. С. Племенная работа с маточными семействами в русской тяжеловозной породе / О. С. Милько // Современное состояние и перспективы развития научных исследований по коневодству : тез. докл. Всесоюзного научного совещания / отв. ред. С. С. Сергиенко. – Дивово : ВНИИ коневодства, 1989. – С. 17-19.

9. Сорокина, И. И. Маточные семейства в микроэволюции владимирской породы / И. И. Сорокина, О. С. Милько, О. В. Евсеева // Пути повышения племенных, спортивных, рабочих и продуктивных качеств лошадей : сб. науч. тр. / отв. ред. С. С. Сергиенко. – Дивово : ВНИИ коневодства, 1992. – С. 40-48.

10. Дайлиденко, В. Н. Влияние продолжительности эмбриогенеза и возраста на воспроизводительные качества кобыл разных пород Республики Беларусь / В. Н. Дайлиденко // Коневодство и конный спорт. – 2005. – № 4. – С. 4-6.

11. Дайлиденко, В. Н. Особенности роста жеребят различной продолжительности эмбриогенеза / В. Н. Дайлиденко // Зоотехническая наука Беларуси : сб. науч. тр. / под ред. И. П. Шейко. – Жодино, 2005. – Т. 40. – С. 47-50.

(поступила 26.02.2010 г.)

УДК 636.2:612.621

В.Ю. ДЕНИСЕНКО, Т.И. КУЗЬМИНА, Н.О. НОВИКОВА

ОБМЕН Ca^{2+} В ООЦИТАХ СВИНЕЙ, ТЕСТИРОВАННЫХ С ПОМОЩЬЮ КРАСИТЕЛЯ ВСВ

ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных РАСХН»

Введение. Интенсификация использования вспомогательных репродуктивных технологий, а также методов клеточной и генной инженерии (клонирование, трансгенез) в свиноводстве сдерживается недостаточным количеством донорских ооцитов, отличающихся высокими потенциальными к дальнейшему созреванию, оплодотворению и развитию из них эмбрионов. В связи с этим, поиски индикаторов качества донорских ооцитов представляют несомненный интерес. Использование красителя ВСВ (brillant cresyl blue) позволяет тестировать растущие и завершившие стадию роста ооциты. ВСВ является витальным голубым красителем, который детерминирует внутриклеточную активность глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы (G6PDH). Фермент G6PDH активен в растущих ооцитах, однако в завершивших стадию роста клетках снижает свою активность [1].

ВСВ тест основан на способности G6PDH конвертировать окраску ВСВ из голубой в бесцветную в растущих ооцитах [2], а в цитоплазме завершивших стадию роста ооцитах ВСВ не теряет цвет. Показано, что высокий уровень G6PDH активности в донорских ооцитах был негативно связан с количеством созревших, оплодотворенных ооцитов и

развитием мужских и женских пронуклеусов [3].

Обнаруженные нами ранее различия в уровне содержания кальция во внутриклеточных депо нормальных и дегенерированных ооцитах явились предпосылкой наших исследований по изучению гомеостаза кальция в растущих и завершивших стадию роста ооцитах свиньи на основе использования ВСВ теста [4].

Материал и методика исследований. В качестве объекта исследований использовали ооциты свиней породы ландрас, убитых на мясокомбинате. В экспериментах использовали яйцники на стадии фолликулярного роста, без признаков видимой патологии. Краситель ВСВ разводили в среде Дюльбеко до конечной концентрации 13 мкМ. Продолжительность инкубации ооцитов в присутствии красителя составляла 60 мин при температуре 37°C. Затем ооциты по цвету окраски распределяли на две группы – неокрашенные (растущие) и окрашенные (завершившие стадию роста). Концентрацию кальция во внутриклеточных депо ооцитов свиней измеряли с помощью флуоресцентного зонда хлортетрациклин (ХТЦ). Ооциты инкубировали в течение 5 мин при 37°C в инкубационной среде, содержащей 40 мкМ ХТЦ. Интенсивность флуоресценции зонда ХТЦ измеряли на флуориметрической установке, состоящей из люминесцентного микроскопа и фотометрической насадкой ФМЭЛ-1А. Комплекс, образованный ХТЦ и Ca^{2+} , связанным с мембранами клетки, возбуждали светом 380-400 нм, флуоресценцию регистрировали в области 530 нм. Интенсивность флуоресценции измеряли в усл. ед. Достоверность различия сравниваемых средних значений для 4-5 независимых экспериментов оценивали с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты эксперимента и их обсуждение. Окрашенные с помощью красителя ВСВ ооциты обозначали как ВСВ "+" ооциты, не имеющие окраски после обработки красителем ооциты – как ВСВ "-" ооциты. ВСВ "+" ооцитами являются завершившие стадию роста ооциты, а к ВСВ "-" ооцитам относятся растущие клетки.

Согласно гипотезе Ghosh et al., ГТФ образует связь между двумя внутриклеточными депо кальция – рианодин- и IP_3 -чувствительными и обеспечивает переход Ca^{2+} из рианодин- в IP_3 -чувствительные. При взаимодействии ГТФ и IP_3 в клетках происходит дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо [5]. Ранее нами было показано, что в ооцитах свиней при совместном действии пролактина и ГТФ отмечалось дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо [6].

С помощью красителя ВСВ ооциты свиньи были разделены на две группы – растущие и завершившие стадию роста, и в каждой из этих групп изучали перемещения Ca^{2+} между различными внутриклеточными депо. При совместном действии пролактина и ГТФ отмечали

различный эффект в растущих и завершивших стадию роста ооцитах свиньи. В завершивших стадию роста ооцитах совместное действие пролактина и ГТФ стимулирует дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо, и этот дополнительный выход Ca^{2+} активировался протеинкиназой С. В растущих ооцитах совместное действие пролактина и ГТФ не стимулирует дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо и протеинкиназа С также не влияет на этот процесс. На основании этих и ранее полученных данных было предположено, что в завершивших стадию роста ооцитах в присутствии пролактина и ГТФ происходит переход Ca^{2+} из рианодин- в IP_3 -чувствительные внутриклеточные депо, и этот переход регулируется протеинкиназой С. В растущих ооцитах свиньи, по-видимому, при взаимодействии пролактина и ГТФ не происходит переход Ca^{2+} между различными внутриклеточными депо, так как не отмечается дополнительный выход Ca^{2+} из внутриклеточных депо.

При использовании теofilлина и ГДФ совместное действие этих соединений стимулирует дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Изучение обмена Ca^{2+} между внутриклеточными депо в растущих и завершивших стадию роста ооцитах свиньи показало, что в обоих типах изучаемых клеток при взаимодействии теofilлина и ГДФ происходит дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо. В растущих, а также завершивших стадию роста ооцитах дополнительный выход Ca^{2+} из внутриклеточных депо активировался протеинкиназой А (рисунки а и б: по горизонтали: 1 – контрольные клетки; 2 – активация теofilлином в концентрации 10 мМ; 3 – 100 мкМ ГДФ; 4 – совместное действие теofilлина и ГДФ; 5 – действии 40 мкМ Н-89; 6 – действие Н-89 с последующей обработкой теofilлином; 7 – действие Н-89 с последующей обработкой ГДФ; 8 – 40 мкМ Н-89 и последующее совместное действие теofilлина и ГДФ. По оси ординат – интенсивность флуоресценции ХТЦ, усл. ед.; а – ВСВ "+" ооциты, б – ВСВ "-" ооциты. Различия достоверны при: а – $P < 0,001$ (1 и 2; 1 и 3; 3 и 4), $P < 0,05$ (2 и 4; 4 и 8); б – $P < 0,001$ (1 и 2; 1 и 3; 2 и 4; 3 и 4)).

Так как теofilлин и ГДФ стимулируют освобождение Ca^{2+} из разных внутриклеточных депо (теofilлин из рианодин-, а ГДФ из IP_3 -чувствительных внутриклеточных депо), то можно предположить, что в данном случае происходит переход Ca^{2+} между различными внутриклеточными депо. В отличие от действия пролактина и ГТФ, когда происходит переход Ca^{2+} из рианодин- в IP_3 -чувствительные депо, при совместном действии теofilлина и ГДФ, возможно, происходит переход Ca^{2+} в обратном направлении, из IP_3 -чувствительных депо в рианодинчувствительные. Этот возможный переход в присутствии теofilлина и ГДФ присутствует, как в растущих, так и завершивших ста-

дию роста ооцитах, тогда как переход Ca^{2+} , стимулированный совместным действием пролактина и ГТФ, происходит только в завершивших стадию роста ооцитах свиньи.

Какова возможная причина, обеспечивающая различие в перемещении Ca^{2+} между внутриклеточными депо в завершивших стадию роста и растущих ооцитах свиньи?

Использование при инкубации *in vitro* растущих донорских ооцитов снижало количество ооцитов, завершивших мейотическое созревание, что, соответственно, обуславливало снижение выхода эмбрионов при оплодотворении *in vitro*. В случае культивирования завершивших стадию роста ооцитах качество созревания и выход эмбрионов были выше, чем при использовании растущих ооцитов. Существует гипотеза, что мейотическое созревание в ооцитах в основном связано с освобождением Ca^{2+} из IP_3 -чувствительных внутриклеточных депо, так как показано, что инъекция реагентов, ингибирующих образование IP_3 , вызывает нарушения в ядерно-цитоплазматическом созревании яйцеклетки, в то время как добавление специфических ингибиторов рианодин-чувствительных рецепторов не оказывает отрицательного действия на мейоз в ооцитах [7]. Так как освобождение Ca^{2+} из IP_3 -чувствительных депо происходит только в завершивших стадию роста ооцитах, становится понятным, почему выше количество и качество созревших ооцитов при использовании ооцитов, завершивших стадию роста. По-видимому, дополнительно появившийся переход Ca^{2+} из рианодин- в IP_3 -чувствительные внутриклеточные депо связан со снабжением кальцием процессов мейоза, который способен полноценно проходить только в завершивших стадию роста ооцитах (рисунки а и б).

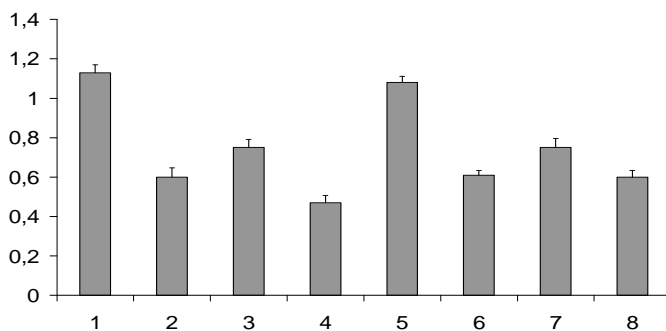


Рисунок а – Влияние ингибирования протеинкиназы А на стимулированное теофиллином и ГДФ освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо ооцитов свиней (BCB "+" ооциты)

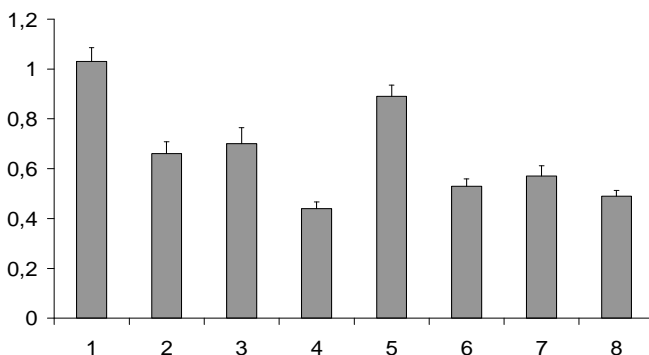


Рисунок б – Влияние ингибирования протеинкиназы А на стимулированное теофиллином и ГДФ освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо ооцитов свиней (BCB "-" ооциты)

Если IP_3 -чувствительные депо кальция обеспечивают в клетках прохождение мейоза, то функционирование рианодин-чувствительных депо кальция, вероятно, связано с какими-то другими внутриклеточными процессами. Возможно, одним из таких процессов является ингибирование реинициации мейоза. У свиней было показано, что тестостерон ингибирует спонтанное созревание ооцитов [8], а добавление тестостерона в среду инкубации стимулирует дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо при совместном действии пролактина и теофиллина. В присутствии тестостерона дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо стимулировалось протеинкиназой А [9]. Полученные данные позволяют предположить, что активация протеинкиназы А в данном случае стимулирует переход Ca^{2+} из IP_3 - в рианодин-чувствительные внутриклеточные депо. В растущих ооцитах свиньи дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо также активируется протеинкиназой А, что, возможно, приводит к переходу Ca^{2+} из IP_3 - в рианодин-чувствительное внутриклеточное депо.

Заключение. Поиски эффективных тестов качества донорских ооцитов свиней – одна из важнейших проблем клеточных репродуктивных технологий. Исследование механизмов клеточной сигнализации в завершивших стадию роста и растущих ооцитах позволяет идентифицировать механизмы, детерминирующие процесс завершения ядерно-цитоплазматического созревания. Опубликованные нами ранее данные показали, что при воздействии пролактина (гормона, используемого при экстракорпоральном дозревании ооцитов) отмечены различия в обмене кальция растущих и выросших ооцитах. В настоя-

щем исследовании на основе поэтапного ингибиторного анализа не выявлено различий в обмене кальция в исходной популяции растущих и закончивших рост ооцитах при воздействии теофеллина и ГДФ. Предложенная модель может быть использована для дальнейшего изучения гомеостаза кальция в ооцитах свиней при их созревании *in vitro*.

Литература

1. Wassarman, M. The mammalian ovum / M. Wassarman // The physiology of reproduction. – New York : Ravan Press, 1988. – Vol. 1. – P. 69-102.
2. Ericsson, S. A. Assessment of porcine oocytes using brilliant cresyl blue / S. A. Ericsson, M. L. Boice, H. Funahashi // Theriogenologie. – 1993. – Vol. 39. – P. 214 [abstract].
3. Кузьмина, Т. И. Факторы, детерминирующие формирование зрелой яйцеклетки млекопитающих *in vitro* / Т. И. Кузьмина, Х. Альм, Х. Торнер // Достижения в генетике, селекции и воспроизводстве сельскохозяйственных животных : сб. науч. тр. / ВНИИГРЖ. – СПб, 2009. – С. 155-160.
4. Денисенко, В. Ю. Зависимость освобождения Ca^{2+} из внутриклеточных депо от уровня NADH и FAD в оплодотворенных и неоплодотворенных яйцеклетках коров / В. Ю. Денисенко, Т. И. Кузьмина, О. В. Шокин // Цитология. – 2005. – Т. 47. – С. 704-708.
5. GTP-activated communication between distinct inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive and -insensitive calcium pools / T. K. Ghosh [et al.] // Nature. – 1989. – Vol. 340. – P. 236-239.
6. Денисенко, В. Ю. Эффект гуаниновых нуклеотидов и протеинкиназы С на стимулированное пролактином освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо ооцитов свиней / В. Ю. Денисенко, Т. И. Кузьмина // Онтогенез. – 2005. – Т. 36. – С. 1-6.
7. Cortical granule translocation during maturation of starfish oocytes requires cytoskeletal rearrangement triggered by $InsP_3$ -mediated Ca^{2+} release / I. Santella [et al.] // Exp. Cell Res. – 1999. – Vol. 248. – P. 567-574.
8. Rice, C. Effect of testosterone and dibutyryl cAMP on the spontaneous maturation of pig oocytes / C. Rice, R. W. McGaughey // Reprod. Fertil. – 1981. – Vol. 62. – P. 245-256.
9. Кузьмина, Т. И. Участие тестостерона в обмене внутриклеточного Ca^{2+} в клетках гранулы свиней / Т. И. Кузьмина, В. Ю. Денисенко // Стратегия развития зоотехнической науки. – Жодино, 2009. – С. 97-99.

(поступила 18.03.2010 г.)