

Проведений цитогенетичний аналіз препаратів ембріонів кролів на різних стадіях розвитку (від двох бластомерів до ранньої морули) підтвердив, що ембріони, які за візуальною морфологічною оцінкою були визначені як нормальні містили повноцінні ядра із ядерцями, кількість яких відповідала кількості бластомерів ембріонів, хроматин цих ядер відповідав стадії розвитку зародка.

Отже, проведеними експериментальними дослідженнями з вивчення впливу ВДК t°C200 в концентрації 0,001 % на ефективність формування зигот кролів в умовах *in vitro* та розвиток ембріонів поза організмом на доімплантаційних стадіях встановлено позитивний вплив даного наноматеріалу на формування та розвиток ембріонів в умовах *in vitro* і отримати вірогідно більшу кількість ембріонів (31 %), які розвинулись до стадії морули. Таким чином, наноматеріал ВДК у складі середовища для культивування ембріонів кролів стимулюють процес дроблення зигот та сприяють розвитку вірогідно більшої кількості ембріонів на доімплантаційних стадіях.

УДК 636.2:612.621

КАЛЬЦИЕВАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ В ООЦИТАХ СВИНЕЙ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ТЕСТОСТЕРОНА

В. Ю. Денисенко, Т. И. Кузьмина
Всероссийский научно-исследовательский институт
генетики и разведения сельскохозяйственных животных,
Санкт-Петербург, Россия

Совершенствование систем дозревания ооцитов свиней *in vitro* – актуальная проблема биотехнологии получения эмбрионов, в том числе трансгенных и клонированных. Моделирование систем дозревания ооцитов подразумевает знание механизмов влияния различных факторов, в том числе гормонов, определяющих потенции ооцитов к оплодотворению и дальнейшему развитию эмбрионов. Основным подходом к решению этой проблемы является изучение механизмов внутриклеточной сигнализации в клетках во время процессов активации и ингибирования мейоза. В настоящее время установлено, что важным моментом внутриклеточной передачи сигналов является изменение транспорта и внутриклеточной концентрации различных ионов. Изменения в транспорте и внутриклеточной концентрации Ca^{2+} играют ключевую роль в запуске и регуляции общих и специализированных клеточных функций, таких как пролиферация, рост, секреция, сокращение и т.д. Стероиды играют важную роль в формировании зрелой яйцеклетки млекопитающих *in vivo*. Известно, что при воздействии тестостерона ингибируется созревание ооцитов, при совме-

стном действии тестостерона и дбцАМФ эффект ингибирования усиливается (Rice, McGaughey, 1981).

Цель настоящей работы – исследование влияния тестостерона на флуктуацию содержания кальция во внутриклеточных депо кальция в ооцитах свиней при реинициации мейоза.

При проведении экспериментов использовали яичники свиней породы ландрас без видимой патологии на стадии фолликулярного роста. Ооцит-кумулюсные комплексы выделяли из фолликулов диаметром 3-6 мм и помещали в физиологический раствор. Только ооциты округлой формы с тонкогранулированной ооплазмой, зоной пеллюцида, равномерной по ширине и окруженной 5-ю и более слоями клеток кумулюса использовали в экспериментах. Инкубацию выделенных ооцитов проводили в модифицированной инкубационной среде Дюльбеко без CaCl_2 , содержащей 36 мг/л пирувата Na и 1 г/л глюкозы. Концентрацию кальция во внутриклеточных депо ооцитов свиней измеряли с помощью флуоресцентного зонда хлортетрациклин. О содержании мембрансвязанного кальция судили по интенсивности флуоресценции комплекса мембрана-хлортетрациклин-кальций. Ооциты инкубировали в течение 5 мин при 37 °С в среде, содержащей 40 мкМ хлортетрациклина. После этого нагруженные клетки 3 раза отмывали в инкубационной среде и переносили на специальное кварцевое стекло. Измерение Ca^{2+} в ооцитах производили в среде Дюльбеко. Интенсивность флуоресценции хлортетрациклина в ооцитах измеряли флуориметрической установкой, состоящей из люминесцентного микроскопа Люмам-И1, снабженного необходимыми светофильтрами и фотометрической насадкой ФМЭЛ-1А. Величина длин волны возбуждения для хлортетрациклина составляла 380, а волны излучения – 530 нм. Содержание в клетках кальция внутриклеточных депо измеряли в условных единицах (усл. ед.) интенсивности флуоресценции.

Согласно гипотезе Ghosh et al., ГТФ образует связь между двумя внутриклеточными депо - рианодин- и инозитол-1,4,5-трифосфат-чувствительными и обеспечивает переход Ca^{2+} из рианодин- в инозитол-1,4,5-трифосфатчувствительные. При взаимодействии ГТФ и инозитол-1,4,5-трифосфата в клетках происходит дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо (Ghosh et al., 1989). ГТФ и инозитолтрифосфат освобождают Ca^{2+} из различных – рианодин- и инозитолтрифосфат-чувствительных внутриклеточных депо. В наших экспериментах соматотропин (СТГ) и теофиллин, добавленные в концентрации 10 нг/мл и 10 мМ соответственно, стимулировали освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Показано, что СТГ и теофиллин также активируют освобождение Ca^{2+} из различных внутриклеточных депо: СТГ – из инозитолтрифосфат-, а теофиллин из рианодинчувствительных депо (Денисенко, Кузьмина, 2010). Дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо при совместном действии соединений, активирующих освобождение Ca^{2+} из различных внутриклеточных депо, свидетельствовать в пользу образования связи между внутриклеточными депо и переходе Ca^{2+} из одного внутриклеточного депо в другое. В присутствии тестостерона при совместном действии

СТГ и теофиллина в ооцитах свиней отмечали дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо.

В образовании связи между внутриклеточными депо могут участвовать различные внутриклеточные структуры, в том числе и цитоскелет. С целью изучения участия цитоскелета в образовании связи между внутриклеточными депо использовали ингибитор полимеризации микротрубочек нокодазол. В обработанных нокодазолом в концентрации 10 мкМ ооцитах свиней отсутствовало дополнительное освобождение Ca^{2+} , стимулированное совместным действием СТГ и теофиллина в присутствии тестостерона.

ГТФ может стимулировать образование связи между внутриклеточными депо и обеспечивать переход Ca^{2+} между ними (Ghosh et al., 1989). Было показано, что ГДФ также способствует образованию связи между внутриклеточными депо кальция, однако в этом случае транслокация кальция происходит в направлении противоположном тому, который стимулировал ГТФ (Денисенко, Кузьмина, 2009). Так как в присутствии тестостерона в ооцитах свиней между внутриклеточными депо, по-видимому, образуется связь, предположили, что один из гуаниновых нуклеотидов (ГТФ или ГДФ) может участвовать в образовании связи между внутриклеточными депо при стимулировании тестостероном. Добавление ГТФ в концентрации 10 мкМ в среду инкубации стимулировало освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо. В то же время на дополнительное освобождение Ca^{2+} , стимулированное совместным действием СТГ и теофиллина в присутствии тестостерона, внесение ГТФ оказывало ингибирующий эффект. Следовательно, ГТФ не участвует в опосредованном тестостероном образовании связи между внутриклеточными депо. Действие ГДФ на освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо связано с переходом ГДФ в ГТФ, и затем уже ГТФ стимулирует выход Ca^{2+} из внутриклеточных депо (Kimura, Shimada, 1983). В то же время в стимулированном ГДФ образовании связи между внутриклеточными депо ГТФ не принимает участия. Если предположить, что ГДФ участвует в стимулированном тестостероном образовании связи между внутриклеточными депо, то становится понятной причина ингибирующего действие ГТФ на дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо, стимулированное совместным действием СТГ и теофиллина.

Таким образом, на основе ингибиторного анализа путем изучения флуктуации содержания кальция во внутриклеточных депо показано, что тестостерон детерминирует образование связи между внутриклеточными депо ооцитов свиней при реинициации мейоза и в этот процесс вовлекаются микротрубочки и ГДФ.