

УДК 636.2:612.621

ВЛИЯНИЕ ЭСТРАДИОЛА НА ОСВОБОЖДЕНИЕ Ca^{2+} ИЗ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ДЕПО ООЦИТОВ СВИНЕЙ, СТИМУЛИРОВАННОЕ ПРОЛАКТИНОМ, ТЕОФИЛЛИНОМ И ГУАНОЗИНТРИФОСФАТОМ

© 2009 г. В. Ю. Денисенко, Т. И. Кузьмина

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных РАСХН

196600 Санкт-Петербург, Пушкин, Московское шоссе, д. 55а

E-mail: prof.kouzmina@mail.ru

Поступила в редакцию 23.04.07 г.

Окончательный вариант получен 26.02.08 г.

С помощью флуоресцентного Ca^{2+} -чувствительного зонда хлортетрациклина исследовано взаимодействие между пролактином и теофиллином, а также пролактином и гуанозинтрифосфатом при освобождении Ca^{2+} из внутриклеточных депо обработанных эстрадиолом ооцитов свиней, выделенных из яичников на стадии фолликулярного роста. В отсутствие эстрадиола отдельно пролактин и теофиллин вызывают выход Ca^{2+} из внутриклеточных депо, однако при их совместном действии не наблюдается дополнительного освобождения Ca^{2+} ; в присутствии же эстрадиола, наоборот, происходит дополнительный выход Ca^{2+} из внутриклеточных депо только при совместном действии пролактина и теофиллина. В отсутствие эстрадиола гуанозинтрифосфат освобождает кальций как при действии его самостоятельно, так и в сочетании с пролактином. Протеинкиназа С регулирует освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо при совместном действии пролактина и теофиллина только в присутствии эстрадиола, для активации протеинкиназы С при совместном действии пролактина и гуанозинтрифосфата эстрадиол не требуется. Полученные данные свидетельствуют о влиянии эстрадиола на освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо при совместном действии пролактина и теофиллина и отсутствии его при совместном действии пролактина и гуанозинтрифосфата.

Ключевые слова: эстрадиол, пролактин, теофиллин, гуанозинтрифосфат, кальций, ооциты.

Воздействие пролактина на клетки связано с увеличением концентрации цитозольного кальция, которое достигается за счет мобилизации Ca^{2+} из внутриклеточных депо, а также входа ионов Ca^{2+} снаружи (Villalba et al., 1991; Doppler, 1994).

Теофиллин в клетках увеличивает концентрацию цАМФ (Досон и др., 1991). Этот нуклеотид влияет на обмен внутриклеточного кальция в клетках. Так, обнаружено, что в овариальных клетках китайского хомячка и клетках слюнных желез крыс цАМФ вызывает освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо путем активации инозитол-1,4,5-чувствительных рецепторов (Zhang, Martinez, 1999; Ikeda et al., 2001), а в пермеабелизованных клетках околушных желез крыс – активируя рианодиновые рецепторы (Rubin, Adolf, 1994).

В клетках различного типа показано, что вторичные посредники, такие как Ca^{2+} и цАМФ, участвуют в реализации действия эстрадиола на клетки. Так, эстрадиол индуцирует быстрое неге-

номное изменение уровня инозитол-1,4,5-трифосфата и освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо (Singh, Gupta, 1997; Marino et al., 1998), а также влияет на синтез циклических нуклеотидов (Farhat et al., 1996). Стимулированный эстрадиолом вход Ca^{2+} в энтероциты и клетки эпителия толстой кишки крыс опосредуется через активацию цАМФ-системы. Эстроген в этих клетках увеличивает концентрацию цАМФ параллельно увеличению количества Ca^{2+} (Picotto et al., 1996; Doolan et al., 2000).

В различных клетках гуанозинтрифосфат способен самостоятельно вызывать освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо, а также стимулировать дополнительный выход Ca^{2+} из внутриклеточных депо при действии инозитолтрифосфата (Chueh, Gill, 1986; Ueda et al., 1986).

Цель работы – исследование влияния эстрадиола на взаимодействие между теофиллином и пролактином, а также пролактином и гуанозинтрифосфатом при освобождении Ca^{2+} из внутриклеточных депо ооцитов свиней.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В работе использовали яичники свиней породы ландрас в фолликулярной стадии без видимой патологии. В яичниках с помощью лезвия разрезали фолликулы диаметром 3–6 мм и освобождали ооцит-кумулюсные комплексы. Выделение ооцит-кумулюсных комплексов проводили в физиологическом растворе. В опытах использовали ооциты округлой формы с тонкогранулированной ооплазмой и равномерной по ширине *zona pellucida*. Инкубацию выделенных ооцитов проводили в модифицированной инкубационной среде Дюльбекко без CaCl_2 , содержащей 36 мг/л пирувата натрия и 1 г/л глюкозы.

Концентрацию кальция во внутриклеточных депо ооцитов свиней измеряли с помощью флуоресцентного зонда хлортетрациклина (ХТЦ). Ооциты инкубировали в течение 5 мин при 37°C в инкубационной среде, содержащей 40 мкМ ХТЦ. Затем клетки три 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 зонда ХТЦ измеряли на флуориметрической установке, состоящей из люминесцентного микроскопа, снабженного ртутной лампой постоянного тока ДРШ-250-3, необходимыми светофильтрами и фотометрической насадкой ФМЭЛ-1А. Комплекс ХТЦ- Ca^{2+} -мембрана возбуждали светом 380–400 нм, флуоресценцию регистрировали в области 530 нм. Интенсивность флуоресценции измеряли в условн. ед. Длительность воздействия ультрафиолетового излучения на ооциты при проведении измерений не превышала 5 с.

В работе использовали следующие реагенты: ингибитор протеинкиназы С Ro 31-8220, ингибитор протеинкиназы А Н-89, тапсигаргин, теofilлин, эстрадиол (“Sigma”, США), гуанозинтрифосфат (“Reanal”, Венгрия), гипофизарный бычий пролактин (20.0 МЕ/мг; Институт эндокринологии, Россия). Время обработки ооцитов этими реагентами составляло 10 мин при температуре 37°C. Ro 31-8220, Н-89 и тапсигаргин растворяли в диметилсульфоксиде, эстрадиол – в этиловом спирте, а ХТЦ, гуанозинтрифосфат, теofilлин и пролактин – в среде Дюльбекко.

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

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 1 представлены данные о влиянии ингибиторов протеинкиназы С Ro 31-8220 (10 нг/мл) и протеинкиназы А Н-89 (40 мкМ) на активированное пролактином и теofilлином освобождение

ние Ca^{2+} из внутриклеточных депо ооцитов свиней, выделенных из яичников на стадии фолликулярного роста. Отдельно пролактин в концентрации 50 нг/мл и теofilлин в концентрации 10 мМ вызывали в ооцитах освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо (рис. 1, а). При совместном действии пролактина и теofilлина не отмечено дополнительного освобождения Ca^{2+} из внутриклеточных депо по сравнению с действием каждого из реагентов в отдельности.

Внесение в среду инкубации с ооцитами Ro 31-8220, специфического ингибитора протеинкиназы С (Dieter, Fitzke, 1991; Keller, Niggli, 1993), приводило к освобождению Ca^{2+} из внутриклеточных депо. После обработки ооцитов этим ингибитором добавление пролактина или теofilлина не стимулировало освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Совместное действие пролактина и теofilлина в присутствии ингибитора протеинкиназы С также не вызывало освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо.

Соединение Н-89 в разных клетках способно действовать на различные протеинкиназы, однако наиболее активно оно в отношении протеинкиназы А (Geilen et al., 1992). Ингибирование в ооцитах протеинкиназы А Н-89 стимулирует освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Следует отметить, что добавление пролактина или теofilлина к ооцитам, обработанным ингибитором протеинкиназы А, не вызывает освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Совместное действие пролактина и теofilлина в таких клетках тоже не оказывает влияния на выход Ca^{2+} из внутриклеточных депо.

В присутствии эстрадиола в концентрации 1 мкг/мл в ооцитах отмечено уменьшение количества кальция, запасенного во внутриклеточных депо (рис. 1, б). В обработанных эстрадиолом ооцитах добавление отдельно пролактина или теofilлина не стимулировало освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Однако совместное действие пролактина и теofilлина в присутствии эстрадиола вызывало в ооцитах освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо.

Ингибирование протеинкиназы С Ro 31-8220 приводило к освобождению Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Последующее добавление к этим ооцитам пролактина или теofilлина не вызывало выход Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Интересно отметить, что стимулированное совместным действием пролактина и теofilлина освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо требует присутствия протеинкиназы С, а при наличии ингибитора фермента стимулирующий эффект совместного действия этих двух веществ отсутствует.

Воздействие на ооциты ингибитора протеинкиназы А Н-89 после обработки их эстрадиолом не стимулировало выход Ca^{2+} из внутриклеточ-

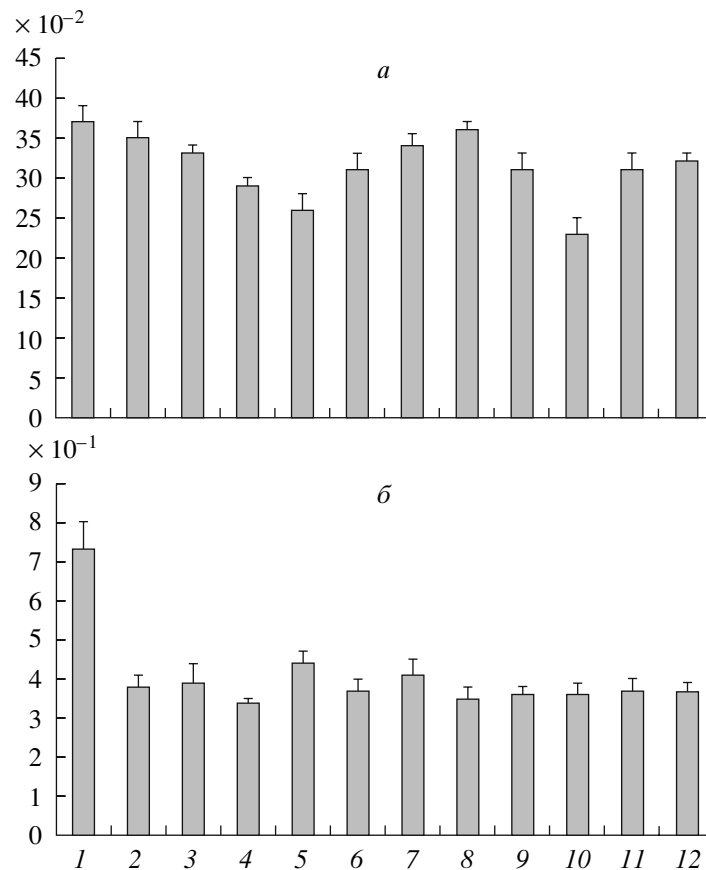


Рис. 1. Влияние ингибиторов протеинкиназы С и А на стимулированное пролактином и теofilлином освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо ооцитов свиней в присутствии (а) и в отсутствие (б) 1 мкг/мл эстрадиола.

По оси абсцисс: 1 – контроль (необработанные ооциты); действие: 2 – пролактина, 50 нг/мл; 3 – теofilлина, 10 мМ; 4 – совместно пролактина и теofilлина; 5 – Ro 31-8220, 10 нг/мл; 6–8 – Ro 31-8220 с последующей обработкой пролактином (6), теofilлином (7), совместно пролактином с теofilлином (8); 9 – Н-89, 40 мкМ; 10–12 – Н-89 с последующей обработкой пролактином (10), теofilлином (11), совместно пролактином с теofilлином (12).

Здесь и далее: представлены изменения Ca^{2+} , полученные в четырех–пяти экспериментах; по оси ординат – интенсивность флуоресценции ХТЦ, условн. ед.

Различия достоверны при: а – $p < 0.001$ (4 и 8; 10 и 12), $p < 0.01$ (2 и 4; 9 и 10), $p < 0.05$ (3 и 4); б – $p < 0.001$ (1 и 2; 1 и 3; 1 и 5), $p < 0.01$ (1 и 3; 1 и 9).

ных депо. Также протеинкиназа А не участвовала в действии теofilлина на Ca^{2+} внутриклеточных депо и оказывала ингибирующее влияние на стимулированное пролактином освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо. При совместном действии пролактина и теofilлина в ооцитах не отмечено изменения интенсивности флуоресценции Ca^{2+} внутриклеточных депо.

Результаты влияния тапсигаргина в концентрации 10 мкМ на стимулированное пролактином и теofilлином освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо ооцитов свиней приведены на рис. 2. В экспериментах были использованы ооциты, обработанные эстрадиолом в концентрации 1 мкг/мл. Видно, что инкубация ооцитов в присутствии тапсигаргина не оказывает влияние на освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо, стимулированное совместным действием пролактина и теofilлина.

Ингибирование протеинкиназы С Ro 31-8220 ограничивало освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо при добавлении пролактина и теofilлина отдельно, а также при совместном воздействии их на ооциты, предварительно обработанные тапсигаргином. Использование ингибитора протеинкиназы А Н-89 не влияло на стимулированное пролактином и теofilлином освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо как необработанных, так и обработанных тапсигаргином ооцитов свиней.

Данные о влиянии тапсигаргина на активированное пролактином и гуанозинтрифосфатом освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо ооцитов представлены на рис. 3. Обработку ооцитов эстрадиолом в данной серии экспериментов не проводили. При совместном действии пролактина и гуанозинтрифосфата в ооцитах отмечали освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Инкубирование

ооцитов в присутствии тапсигаргина и последующее добавление пролактина вызывало ингибирование освобождения Ca^{2+} из внутриклеточных депо, тогда как внесение в среду инкубации гуанозинтрифосфата не оказывало влияния на него. Совместное действие пролактина и гуанозинтрифосфата на обработанные тапсигаргином клетки не стимулировало дополнительного освобождения Ca^{2+} из внутриклеточных депо. Ингибирование протеинкиназы С при совместном действии пролактина и гуанозинтрифосфата ограничивало освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо как необработанных, так и обработанных тапсигаргином ооцитов свиней.

ОБСУЖДЕНИЕ

Освобождение ооцита из фолликула приводит к активации механизмов реинициации мейоза. Согласно одной из гипотез, регулирующим фактором, определяющим индукцию созревания, является цАМФ. Возобновление мейоза в фолликуле стимулируется кратковременным увеличением уровня цАМФ, а для реинициации созревания необходимо последующее его уменьшение (Ekholm et al., 1984). Однако предположение, что реинициация мейоза происходит вследствие падения уровня цАМФ, не согласуется с данными ряда авторов, свидетельствующими о том, что при этом уровень цАМФ в ооците не уменьшается (Downs et al., 1988; Moog, 1988). Если считать, что концентрация цАМФ во время реинициации мейоза не уменьшается, то необходимо предположить, что должны существовать механизмы, посредством которых нейтрализуется ингибирующее действие цАМФ.

Возможно, одним из них является повышение концентрации эстрадиола. Показано, что во время преовуляторного выброса гормонов наряду с другими гормонами в фолликулярной жидкости увеличивается концентрация эстрадиола (Healy, Burger, 1983). Повышение внутриклеточной концентрации цАМФ в ооцитах достигали путем использования ингибитора внутриклеточных фосфодиэстераз теофиллина (Досон и др., 1991).

Для индукции созревания ооцитов необходимо увеличение концентрации внутриклеточного кальция, так как было показано, что созревание блокируется при инъекции в клетку хелаторов кальция (Pesty et al., 1998). Увеличение освобождения Ca^{2+} из внутриклеточных депо наблюдалось только тогда, когда взаимодействие между пролактином и теофиллином происходило в присутствии эстрадиола. Пролактин в данном случае использовался не случайно, так как известно, что эстрадиол активирует увеличение его концентрации в организме путем активации ЦНС (Healy, Burger, 1983). С помощью ингибитора Ca^{2+} -АТФаз тапсигаргина было показано, что пролактин и тео-

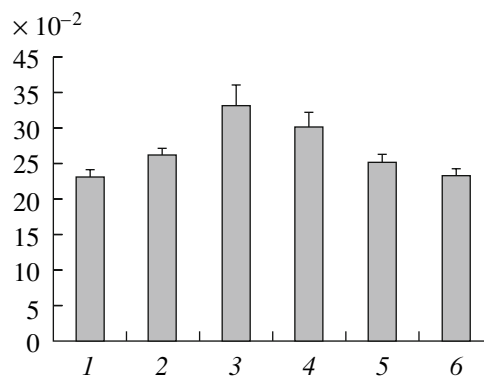


Рис. 2. Влияние тапсигаргина на стимулированное пролактином и теофиллином освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо ооцитов свиней.

По оси абсцисс: 1 – контроль (совместное действие 50 нг/мл пролактина и 10 мМ теофиллина в присутствии 1 мкг/мл эстрадиола); действие: 2 – тапсигаргина, 10 мкМ; 3 – Ro 31-8220, 10 нг/мл; 4 – совместно тапсигаргина и Ro 31-8220; 5 – Н-89, 40 мкМ; 6 – совместно тапсигаргина и Н-89.

Различия достоверны при: $p < 0.01$ (1 и 3), $p < 0.05$ (2 и 4).

филлин (Денисенко и др., 2007) освобождают Ca^{2+} из различных внутриклеточных депо – пролактин из инозитол-1,4,5-чувствительных, а теофиллин – из рианодинчувствительных. Как и теофиллин, гуанозинтрифосфат освобождал Ca^{2+} из рианодинчувствительных депо, однако дополнительное освобождение Ca^{2+} из депо при совместном дей-

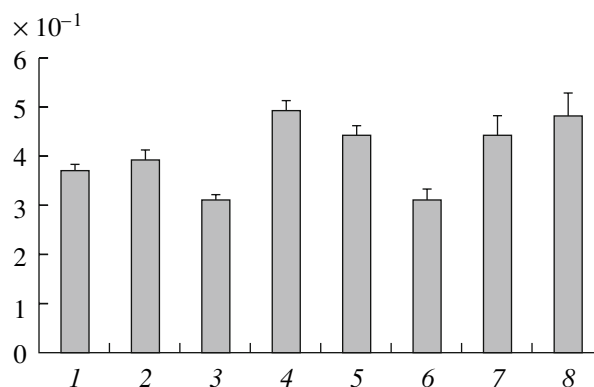


Рис. 3. Влияние тапсигаргина на стимулированное пролактином и GTP освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо ооцитов свиней.

По оси абсцисс: 1 – активация ооцитов пролактином, 50 нг/мл; действие: 2 – GTP, 10 мкМ; 3 – совместно пролактина и гуанозинтрифосфата; 4–6 – тапсигаргина, 10 мкМ с последующей обработкой пролактином (4), гуанозинтрифосфатом (5), пролактином совместно с гуанозинтрифосфатом (6); 7 – Ro-318220, 10 нг/мл и последующее совместное действие пролактина и гуанозинтрифосфата; 8 – обработка ооцитов тапсигаргином и Ro 31-8220 и последующее совместное действие пролактина и гуанозинтрифосфата.

Различия достоверны при: $p < 0.001$ (2 и 3; 6 и 8), $p < 0.01$ (1 и 3; 1 и 4; 3 и 7; 6 и 7).

ствии пролактина и гуанозинтрифосфата происходило в отсутствие эстрадиола.

Существует гипотеза, согласно которой гуанозинтрифосфат образует связь между рианодин- и инозитол-1,4,5-чувствительными внутриклеточными депо кальция и обеспечивает переход Ca^{2+} из рианодин- в инозитол-1,4,5-чувствительные внутриклеточные депо кальция, в результате чего происходит дополнительное освобождение Ca^{2+} при активации клеток инозитол-1,4,5-трифосфатом (Mullaney et al., 1987; Ghosh et al., 1989). Модификация внутриклеточных депо с помощью гуанозинтрифосфата зависит от цитоскелета (Hajnoszky et al., 1994). Гуанозинтрифосфат необходим для полимеризации тубулина (Timasheff, Grisham, 1980), он также контролирует организацию цитоскелета через Rho-семейство малых G-белков (Chardin et al., 1989; Paterson et al., 1990). Факт, что каждый из этих компонентов модулируется гормоном или ростовыми факторами (Downey et al., 1991; Ridley, Hall, 1992), предполагает, что коммуникация между внутриклеточными депо может быть целью внутриклеточной регуляции.

В действии на клетки тапсигаргина есть одна особенность – он ингибирует введение Ca^{2+} во внутриклеточные депо, но не влияет на освобождение Ca^{2+} из них. Если при совместном действии пролактина и гуанозинтрифосфата переход Ca^{2+} происходит из инозитол-1,4,5-чувствительных депо в рианодинчувствительные, то в присутствии тапсигаргина дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо не должно происходить, так как инозитол-1,4,5-чувствительные депо в этом случае пустые. Если переход между Ca^{2+} -депо идет в обратном направлении – из рианодин- в инозитол-1,4,5-чувствительные депо, то в присутствии тапсигаргина дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо может происходить, так как Ca^{2+} поступает из рианодинчувствительных депо, которые гуанозинтрифосфат не способен значительно опустошить при самостоятельном действии. В наших экспериментах показано, что в присутствии тапсигаргина при совместном действии пролактина и гуанозинтрифосфата дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо происходит. Дополнительное освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо при взаимодействии пролактина и гуанозинтрифосфата наблюдается в присутствии протеинкиназы С, так как при ингибировании фермента выход Ca^{2+} из внутриклеточных депо прекращается. Следовательно, можно предположить, что и в ооцитах свиньи при взаимодействии пролактина и гуанозинтрифосфата происходит переход Ca^{2+} между внутриклеточными депо. Этот переход регулируется протеинкиназой С, направление движения Ca^{2+} – из рианодин- в инозитол-1,4,5-чувствительные внутриклеточные депо, из которых Ca^{2+} и освобождается.

Переход Ca^{2+} между внутриклеточными депо возможен только в случае, если активируются оба типа внутриклеточных депо – рианодин- и инозитол-1,4,5-чувствительные. При взаимодействии пролактина и теофиллина происходит активация обоих типов внутриклеточных депо. Кроме того, в присутствии тапсигаргина при взаимодействии пролактина и теофиллина отмечается освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо, и это освобождение Ca^{2+} также находится под контролем протеинкиназы С. Таким образом, можно предположить, что при взаимодействии пролактина и теофиллина в присутствии эстрадиола происходит переход Ca^{2+} из рианодин- в инозитол-1,4,5-чувствительные внутриклеточные депо, из которых он и освобождается.

Если в присутствии эстрадиола при взаимодействии пролактина и теофиллина происходит выход Ca^{2+} из внутриклеточных депо, то почему его нет в отсутствие эстрадиола? Ранее с использованием ингибитора рианодинчувствительных рецепторов рутениевого красного мы показали, что стимулированное гуанозинтрифосфатом освобождение Ca^{2+} не связано с активацией рианодинных рецепторов. Напротив, теофиллин в ооцитах свиньи стимулирует рианодинчувствительные внутриклеточные рецепторы (Денисенко и др., 2007). Можно предположить, что одной из причин отсутствия освобождения Ca^{2+} из внутриклеточных депо при взаимодействии пролактина и теофиллина является активация теофиллином рианодинных рецепторов. Вероятно, действие эстрадиола направлено на образование связи между внутриклеточными депо, в результате чего становится возможным переход Ca^{2+} между ними.

Таким образом, как, не изменяя концентрацию цАМФ, обеспечить реинициацию мейоза, которая происходит при увеличенной концентрации внутриклеточного кальция? Инозитол-1,4,5-трифосфат является главным кандидатом освобождения Ca^{2+} , необходимого для мейоза, так как инъекция реагентов, ингибирующих образование инозитол-1,4,5-трифосфата или его связывание с рецепторами, задерживает или предотвращает нормальное созревание, в то время как добавление специфических ингибиторов рианодинчувствительных рецепторов рутениевого красного или прокаина не оказывает действия на мейоз (Noh, Han, 1998; Santella et al., 1999).

Прохождение мейоза требует увеличения концентрации внутриклеточного Ca^{2+} . цАМФ в ооцитах освобождает Ca^{2+} из рианодинчувствительных депо, активируя рианодинчувствительные рецепторы. Кальция, освобождаемого из этих депо, или недостаточно для прохождения мейоза, или он не участвует в этом процессе. Увеличение концентрации эстрадиола обеспечивает рост концентрации пролактина. Пролактин в ооцитах сви-

ны активирует инозитол-1,4,5-чувствительные депо Ca²⁺, цАМФ – рианодинчувствительные, эстрадиол обеспечивает связь между этими двумя типами депо и способствует переходу Ca²⁺ между депо. В уменьшении концентрации цАМФ в таком случае нет необходимости, более высокий уровень цАМФ, по-видимому, даже полезен, так как позволяет перейти в инозитол-1,4,5-чувствительные депо большому количеству Ca²⁺.

На основании литературных и наших данных мы предлагаем следующую гипотезу: одним из факторов, обеспечивающих реинициацию мейоза, является эстрадиол. Он образует связь между двумя внутриклеточными депо (инозитол-1,4,5-чувствительными и рианодинчувствительными), увеличивает концентрацию фактора, активирующего инозитол-1,4,5-чувствительные депо (пролактина), а также обеспечивает переход Ca²⁺ между внутриклеточными депо, что в результате приводит к увеличению концентрации Ca²⁺, необходимого для прохождения мейоза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Денисенко В.Ю., Кузьмина Т.И., Мурза Г.В. Влияние эстрадиола на освобождение Ca²⁺ из внутриклеточных депо ооцитов свиньи, стимулированное совместным действием пролактина и теофиллина // Цитология. 2007. Т. 49. № 9. С. 739–740.
- Досон Р., Элиот Д., Элиот У. и др. Справочник биохимика. М.: Мир, 1991. 543 с.
- Chardin P., Boquet P., Madaule P. et al. The mammalian G protein rhoC is ADP-ribosylated by *Clostridium botulinum* exoenzyme C3 and affects actin microfilaments in *Vero* cells // EMBO J. 1989. V. 8. P. 1087–1092.
- Chueh S.H., Gill D.L. Inositol 1,4,5-trisphosphate and guanine nucleotides activate calcium release from endoplasmic reticulum via distinct mechanisms // J. Biol. Chem. 1986. V. 261. P. 13883–13886.
- Dieter P., Fitzke E. Ro 31-8220 and Ro 31-7549 show improved selectivity for protein kinase C over staurosporine in macrophages // Biochem. Biophys. Res. Comm. 1991. V. 181. P. 396–401.
- Doolan C.M., Condliffe S.B., Harvey B.J. Rapid non-genomic activation of cytosolic cyclic AMP-dependent protein kinase activity and [Ca²⁺]_i by 17beta-oestradiol in female rat distal colon // Br. J. Pharmacol. 2000. V. 129. P. 1375–1386.
- Doppler W. Regulation of gene expression by prolactin // Rev. Physiol. Biochem. Pharm. 1994. V. 124. P. 93–130.
- Downey G.P., Elson E.L., Schwab B. et al. Biophysical properties and microfilament assembly in neutrophils: modulation by cyclic AMP // J. Cell Biol. 1991. V. 114. P. 1179–1190.
- Downs S.M., Daniel S.A.J., Eppig J.J. Induction of maturation in cumulus cell-enclosed mouse oocytes by follicle-stimulating hormone and epidermal growth factor: evidence for a positive stimulus of somatic cell origin // J. Exp. Zool. 1988. V. 245. P. 86–95.
- Ekholm C., Hillensj T., Magnusson C. et al. Stimulation and inhibition of rat oocyte meiosis by forskolin // Biol. Reprod. 1984. V. 30. P. 537–543.
- Farhat M.Y., Abi-Younes S., Ramwell P.W. Nongenomic effects of oestrogen and the vessel wall // Biochem. Pharmacol. 1996. V. 51. P. 571–576.
- Geilen C.C., Wieprecht M., Wieder T. et al. A selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-bromocinnamyl (amino)ethyl] 5-isoquinoline sulfonamide (H-89), inhibits phosphatidylcholine biosynthesis in Hela cells // FEBS Lett. 1992. V. 309. P. 381–384.
- Ghosh T.K., Mullaney J.M., Tarazy F.I. et al. GTP-activated communication between distinct inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive and -insensitive calcium pools // Nature. 1989. V. 340. P. 236–239.
- Hajnoczky G., Lin C., Thomas A. Luminal communication between intracellular calcium stores modulated by GTP and the cytoskeleton // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 10280–10287.
- Healy D.L., Burger H.I. Serum follicle stimulating hormone, luteinizing hormone, and prolactin during the induction of ovulation with exogenous gonadotropin // J. Clin. Endocrin. Metab. 1983. V. 56. P. 474–481.
- Ikeda M., Nelson C.S., Shinagawa H. et al. Progesterone-induced increase of sperm cytosolic calcium is enhanced by previous fusion of spermatozoa to prostasomes // Cell Calcium. 2001. V. 30. P. 222–227.
- Keller H.U., Niggli V. The PKC-inhibitor Ro 31-8220 selectively suppresses PMA- and diacylglycerol-induced fluid pinocytosis and actin polymerization in PMNs // Biochem. Biophys. Res. Comm. 1993. V. 194. P. 1111–1116.
- Marino M., Pallottini V., Trentalange A. Estrogens cause rapid activation of IP₃-PKC-alpha signal transduction pathway in HEPG2 cells // Ibid. 1998. V. 245. P. 254–258.
- Moor R.M. Regulation of the meiotic cycle in oocytes of domestic mammals // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1988. V. 541. P. 248–258.
- Mullaney J.M., Chueh S.H., Ghosh T.K. et al. Intracellular calcium uptake activated by GTP. Evidence for a possible guanine nucleotide-induced transmembrane conveyance of intracellular calcium // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. P. 13865–13872.
- Noh S.I., Han J.K. 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. 1998. V. 280. P. 45–56.
- Paterson H.F., Self A.J., Garrett M.D. et al. Microinjection of recombinant p21rho induces rapid changes in cell morphology // J. Cell Biol. 1990. V. 111. P. 1001–1007.
- Pesty A., Avazeri N., Lefevre R. Nuclear calcium release by InsP₃-receptor channels plays a role in meiosis reinitiations in the mouse oocyte // Cell Calcium. 1998. V. 24. P. 239–251.
- Picotto G., Massheimer V., Boland R. Acute stimulation of intestinal cell calcium nflux induced by 17beta-estradiol via the cAMP messenger system // Mol. Cell. Endocrinol. 1996. V. 119. P. 129–134.
- Ridley A.J., Hall A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers

in response to growth factors // *Cell*. 1992. V. 70. P. 389–399.

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

Santella I., De Riso I., Gragnaniello G. et al. Cortical granule translocation during maturation of starfish oocytes requires cytoskeletal rearrangement triggered by InsP₃-mediated Ca²⁺ release // *Exp. Cell Res.* 1999. V. 248. P. 567–574.

Singh S., Gupta P.D. Induction of phosphoinositide-mediated signal transduction pathway by 17β-estradiol in rat vaginal epithelial cells // *J. Mol. Endocrinol.* 1997. V. 19. P. 249–257.

Timasheff S.N., Grisham L.M. *In vitro* assembly of cytoplasmic microtubules // *Annu. Rev. Biochem.* 1980. V. 49. P. 565–591.

Ueda T., Chueh S.H., Noel M.W. et al. Influence of inositol 1,4,5-trisphosphate and guanine nucleotides on intracellular calcium release within the N1E-115 neuronal cell line // *J. Biol. Chem.* 1986. V. 261. P. 3184–3192.

Villalba M., Zabala M.T., Martinez-Serrano A. et al. Prolactin increases cytosolic free calcium concentration in hepatocytes of lactating rats // *Endocrinology*. 1991. V. 129. P. 2857–2861.

Zhang G.H., Martinez J.R. Effects of forskolin, dibutyryl cAMP and H-89 on Ca²⁺ mobilization in submandibular salivary cells of newborn rats // *Arch. Oral. Biol.* 1999. V. 44. P. 735–744.

Effect of Estradiol on Ca²⁺ Release from Intracellular Stores in Porcine Oocytes Stimulated by Prolactin, Theophylline, or Guanosine Triphosphate

V. Yu. Denisenko and T. I. Kuz'mina

All-Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding, Moskovskoe sh. 55a, Pushkin, St. Petersburg, 196620 Russia

e-mail: prof.kouzmina@mail.ru

Abstract—The interaction between prolactin and theophylline as well as between prolactin and guanosine triphosphate during Ca²⁺ release from intracellular stores of estradiol-treated porcine oocytes isolated from the ovary at the stage of follicular growth were studied using fluorescent Ca²⁺-sensitive probe chlortetracycline. In the absence of estradiol, prolactin or theophylline induced Ca²⁺ release from intracellular stores; however, no increase in Ca²⁺ release was observed after their combined action. Conversely, Ca²⁺ release from intracellular stores increased only after the combined exposure to prolactin and theophylline in the presence of estradiol. In the absence of estradiol, guanosine triphosphate induced calcium release alone and together with prolactin. Protein kinase C regulated Ca²⁺ release from intracellular stores after the combined exposure to prolactin and theophylline only in the presence of estradiol; while the activation of protein kinase C required no estradiol during the combined exposure to prolactin and guanosine triphosphate. The data obtained indicate the effect of estradiol on Ca²⁺ release from intracellular stores after the combined exposure to prolactin and theophylline, while no such effect was observed after the combined exposure to prolactin and guanosine triphosphate.

Key words: estradiol, prolactin, theophylline, guanosine triphosphate, calcium, oocytes.