

УДК 636.2:612.621

## ОСВОБОЖДЕНИЕ $Ca^{2+}$ ИЗ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ДЕПО ООЦИТОВ СВИНЕЙ НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ РОСТА

© 2011 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 05.11.10 г.

Окончательный вариант получен 30.04.10 г.

Исследовано освобождение  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо ооцитов свиней с помощью  $Ca^{2+}$ -чувствительного флуоресцентного зонда хлортетрациклин. Селекция ооцитов на растущие и завершившие стадию роста проведена с помощью витального красителя бриллиантового голубого (BCB); окрашенные ооциты (BCB "+") определяли как закончившие рост, неокрашенные (BCB "-") находились на завершении фазы роста. В BCB "+" и BCB "-" ооцитах пролактин, теофиллин, ГТФ и ГДФ вызывают освобождение  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо. В завершивших стадию роста ооцитах совместное действие пролактина и ГТФ активирует дополнительное освобождение  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо, в котором участвует протеинкиназа С; в растущих ооцитах совместное действие пролактина и ГТФ не вызывает дополнительного выхода  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо. Совместное действие теофиллина и ГДФ в растущих и завершивших стадию роста ооцитах способствует дополнительному освобождению  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо, и это освобождение регулируется протеинкиназой А. Полученные данные свидетельствуют о различных путях освобождения  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо в растущих и завершивших стадию роста ооцитах свиньи.

*Ключевые слова:* кальций, ооциты свиньи, BCB.

Увеличение концентрации внутриклеточного кальция в клетках происходит вследствие входа внеклеточного кальция и освобождения кальция из внутриклеточных депо (Berridge, Irvine, 1989; Berridge, 2004). Основными внутриклеточными депо, из которых осуществляется выход кальция, являются рианодин- и  $IP_3$ -чувствительные. В ооцитах различных видов животных показано присутствие депо обоих типов (Yue et al., 1995; Machaty et al., 1997). При созревании ооцитов происходят интрацеллюлярные преобразования, часть из которых связана с формированием внутриклеточных депо. В незрелых ооцитах свиньи внутриклеточные депо кальция окончательно не сформированы, при завершении роста ооцитов отмечается увеличение размера внутриклеточных депо, и количество кальция, запасенного в них, возрастает (Machaty et al., 1997).

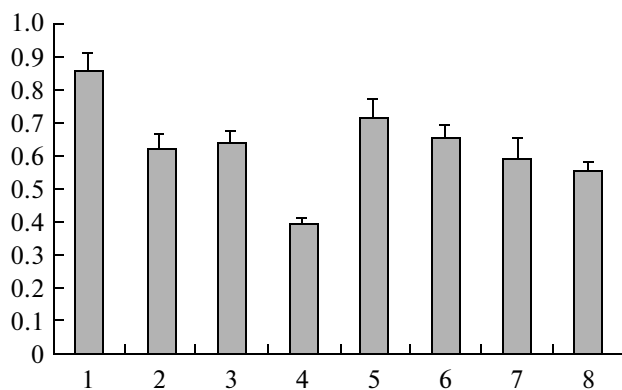
Бриллиантовый голубой (BCB) является витальным красителем, который свидетельствует о внутриклеточной активности фермента глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы (G6PDH) (Alm et al., 2005). В ооцитах синтезируются различные белки (Wassarman, 1988), включая G6PDH. Активность этого фермента существенна в растущих ооцитах, однако, в клетках, завершивших стадию роста, она снижается. BCB-тест

основан на способности G6PDH конвертировать BCB из голубой окраски в бесцветную. Это наблюдается в растущих ооцитах (Ericsson et al., 1993). В цитоплазме завершивших стадию роста ооцитах BCB не теряет свой цвет.

Цель настоящего исследования – идентификация путей сигнальной трансдукции в ооцитах в зависимости от их функционального статуса (растущие и завершившие стадию роста) на основе исследования флуктуации содержания  $Ca^{2+}$  во внутриклеточных депо.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В качестве объекта исследований использовали ооциты свиней, забитых на мясокомбинате. Ооцит-кумуляционные комплексы выделяли из яичников на стадии фолликулярного роста, без признаков видимой патологии аспирацией фолликулов диаметром 3–6 мм. В опытах использовали ооциты округлой формы, с тонкогранулированной ооплазмой и равномерной по ширине зоной пеллюцида. Инкубацию выделенных ооцитов проводили в модифицированной инкубационной среде Дюльбекко без



**Рис. 1.** Влияние ингибирования протеинкиназы С на стимулированное пролактином и ГТФ освобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо ВСВ “+” ооцитов свиней. По горизонтали: 1 – контрольные клетки; 2 – активация пролактином в концентрации 50 нг/мл; 3 – 10 мкМ ГТФ; 4 – совместное действие пролактина и ГТФ; 5 – действие 10 нг/мл Ro 31-8220; 6 – действие Ro 31-8220 с последующей обработкой пролактином; 7 – действие Ro 31-8220 с последующей обработкой ГТФ; 8 – 10 нг/мл Ro 31-8220 и последующее совместное действие пролактина и ГТФ. По оси ординат – интенсивность флуоресценции ХТЦ, усл. ед. Различия достоверны при:  $P < 0.001$  (1 и 2; 1 и 3; 2 и 4; 3 и 4). Здесь и далее представлены изменения  $\text{Ca}^{2+}$ , полученные в 4–5 экспериментах.

$\text{CaCl}_2$ , содержащей 36 мг/л пирувата Na и 1 г/л глюкозы.

При приготовлении маточного раствора ВСВ (бриллиантового голубого кристаллического) использовали среду PBS с 0.4%-ным ВСА. Концентрация ВСВ в маточном растворе составляла 260 мкМ. Окрашивание ооцитов свиньи проводили совместно с клетками кумулюса при концентрации ВСВ 13 мкМ. Продолжительность инкубации ооцитов в присутствии красителя составляла 60 мин при температуре 37°C. Объем раствора красителя, необходимого для окраски одного ооцита, был равен 200 мкл. По цвету окраски ооциты распределяли на две группы – окрашенные (завершившие стадию роста) и неокрашенные (растущие). Выбор концентрации и времени экспозиции основывался на данных, полученных Roca (Roca et al., 1998).

Уровень содержания кальция во внутриклеточных депо ооцитов свиней измеряли с помощью флуоресцентного зонда хлортетрациклин (ХТЦ). Ооциты экспонировали 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  $\text{Ca}^{2+}$  флуоресценцию ХТЦ регистрировали в ооцитах в среде Дюльбекко.

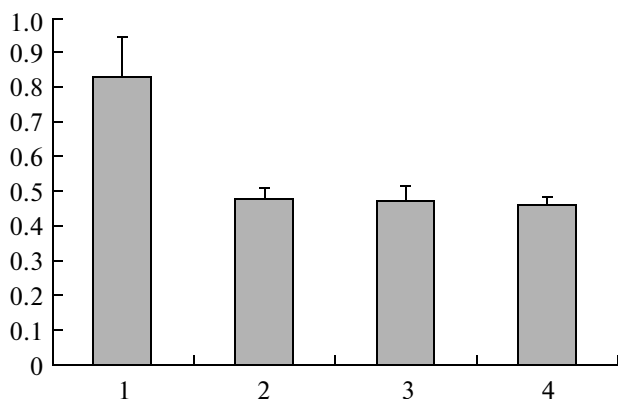
Интенсивность флуоресценции зонда ХТЦ измеряли на флуориметрической установке, состоящей из люминесцентного микроскопа, снабженного необходимыми светофильтрами и фотометрической насадкой ФМЭЛ-1А. Комплекс ХТЦ- $\text{Ca}^{2+}$ -мембрана возбуждали светом 380–400 нм, флуоресценцию регистрировали в области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

В работе использовали следующие реагенты: инкубационную среду Дюльбекко, не содержащую  $\text{CaCl}_2$ , ингибитор протеинкиназы С Ro 31-8220, ингибитор протеинкиназы А Н-89, теофиллин, ВСВ (“Sigma”, США), ХТЦ (“ICN”, США), гуанозинтрифосфат, гуанозиндифосфат (“Reanal”, Венгрия), гипофизарный бычий пролактин (20.0 МЕ/мг; Институт эндокринологии, Москва). Ro 31-8220 и Н-89 растворяли в диметилсульфоксиде, остальные реактивы в среде Дюльбекко.

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

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

После селекции исходной популяции ооцит-кумулюсных комплексов с учетом морфологических критериев (число слоев окружающего ооцит кумулюса, гомогенность ооплазмы и ширина зоны пеллюцида), ооцит-кумулюсные комплексы, без признаков видимой дегенерации, инкубировали в среде с ВСВ. В экспериментах использовали окрашенные ооциты (ВСВ “+”) и ооциты, лишённые окраски (ВСВ “–”). Показано, что окрашенные ВСВ ооциты свиней значительно больше в диаметре, чем неокрашенные (113 мкм против 103 мкм) (Roca et al., 1998). В соответствии с литературными данными ВСВ “+” ооциты определены, как завершившие стадию роста, а ВСВ “–” ооциты – находящиеся в фазе ее завершения (Alm et al., 2005). Результаты экспериментов по оценке влияния ингибирования протеинкиназы С на вызванное пролактином и ГТФ освобождение  $\text{Ca}^{2+}$  в ВСВ “+” ооцитах свиней показаны на рис. 1. Внесение в среду инкубации пролактин в концентрации 50 нг/мл или ГТФ в концентрации 10 мкМ приводило к освобождению  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо ооцитов. Совместное действие пролактина и ГТФ вызывало дополнительный выход  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо. Обработка ооцитов ингибитором протеинкиназы С соединением Ro 31-8220 в концентрации 10 нг/мл также приводила к освобождению  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточ-

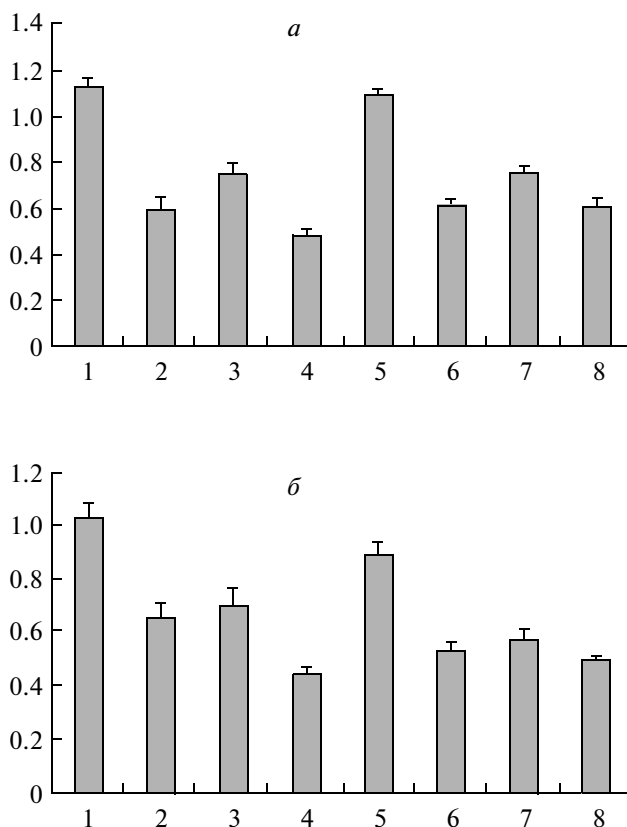


**Рис. 2.** Влияние пролактина и ГДФ на освобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо ВСВ “–” ооцитов свиней. По горизонтали: 1 – контрольные клетки; 2 – активация пролактином в концентрации 50 нг/мл; 3 – 10 мкМ ГДФ; 4 – совместное действие пролактина и ГДФ. По оси ординат – интенсивность флуоресценции ХТЦ, усл. ед. Различия достоверны при:  $P < 0.01$  (1 и 2; 1 и 3).

ных депо. Последующее добавление к обработанным ингибитором ооцитам пролактина или ГДФ не изменяло выход  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо по сравнению с необработанными ооцитами, однако, при совместном действии пролактина и ГДФ в обработанных ингибитором протеинкиназы С ооцитах не отмечали дополнительного освобождения  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо.

Результаты экспериментов об эффектах пролактина и ГДФ на выход  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо ВСВ “–” ооцитов свиней представлены на рис. 2. Показано, что в таких ооцитах добавление пролактина или ГДФ стимулирует освобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо. Однако, в отличие от ВСВ “+” ооцитов в ВСВ “–” ооцитах совместное действие пролактина и ГДФ не вызывает дополнительного освобождения  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо.

Результаты влияния ингибирования протеинкиназы А на стимулированное теofilлином и ГДФ освобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо ооцитов свиней показаны на рис. 3. В ВСВ “+” ооцитах использование теofilлина в концентрации 10 мМ или ГДФ в концентрации 100 мкМ вызывало освобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо (рис. 3, а). Совместное действие теofilлина и ГДФ стимулировало в ооцитах дополнительное освобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо. Обработка клеток ингибитором протеинкиназы А соединением Н-89 в концентрации 40 мкМ не влияла на уровень содержания  $\text{Ca}^{2+}$  во внутриклеточных депо. Воздействие ингибитора протеинкиназы А также не оказывало влияние на стимулированное теofilлином или



**Рис. 3.** Влияние ингибирования протеинкиназы А на стимулированное теofilлином и ГДФ освобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо ооцитов свиней. По горизонтали: 1 – контрольные клетки; 2 – активация теofilлином в концентрации 10 мМ; 3 – 100 мкМ ГДФ; 4 – совместное действие теofilлина и ГДФ; 5 – действие 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).

ГДФ освобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо, однако, при совместном действии теofilлина и ГДФ в таких ооцитах отсутствовало дополнительное освобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо.

В ВСВ “–” ооцитах, как и в ВСВ “+” ооцитах, стимулируется освобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо как при действии отдельно теofilлина или ГДФ, так и при совместном действии теofilлина и ГДФ (рис. 3, б). Ингибирование протеинкиназы А в ВСВ “–” ооцитах не оказывало влияние на стимулированный теofilлином или ГДФ выход  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо, и, аналогично действию в ВСВ “+” ооцитах, обусловило отсутствие дополнительного освобождения  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо.

точных депо при совместном действии теофиллина и ГДФ.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее рядом зарубежных исследователей было высказано предположение, что 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, которое является одним из показателей перехода кальция (Mullaney et al., 1987; Ghosh et al., 1989). В предыдущих исследованиях нами показано, что в ооцитах свиней при совместном действии пролактина и ГТФ отмечается дополнительное освобождение  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо (Денисенко, Кузьмина, 2007). Пролактин и ГТФ в этих экспериментах освобождали  $Ca^{2+}$  из различных внутриклеточных депо — пролактин из  $IP_3$ -чувствительных, а ГТФ — из рианодинчувствительных внутриклеточных депо кальция.

С помощью красителя ВСВ ооциты свиньи были разделены на две группы — растущие и завершившие стадию роста, и в каждой из этих групп изучали освобождение  $Ca^{2+}$  из различных внутриклеточных депо. В результате проведенных экспериментов выявлены особенности в механизмах внутриклеточной сигнализации в зависимости от физиологического статуса ооцитов. Отмечали неоднозначный эффект при совместном действии пролактина и ГТФ 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, в котором участвует протеинкиназа 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 представленных в исследовании результатов и полученных ранее данных логично предположить, что в присутствии пролактина и ГТФ в ооцитах свиньи происходит переход  $Ca^{2+}$  из рианодин- в  $IP_3$ -чувствительные внутриклеточные депо, так как пролактин и ГТФ освобождают  $Ca^{2+}$  из различных внутриклеточных депо и при их взаимодействии происходит дополнительное освобождение  $Ca^{2+}$ , которое в данном случае может регулироваться протеинкиназой С.

Дополнительное освобождение  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо также отмечается при совместном

действии теофиллина и ГДФ, и это освобождение предположительно регулируется протеинкиназой А. Такой эффект используемых соединений отмечали как в растущих, так и в завершивших стадию роста клетках. Теофиллин и ГДФ также стимулируют освобождение  $Ca^{2+}$  из различных внутриклеточных депо: теофиллин — из рианодин-чувствительных внутриклеточных депо, а ГДФ — из  $IP_3$ -чувствительных, что было показано в наших ранних работах (Денисенко, Кузьмина, 2009а). Вероятно, и при совместном действии теофиллина и ГДФ, также происходит переход  $Ca^{2+}$  между различными внутриклеточными депо, однако направление перехода  $Ca^{2+}$  противоположное — из  $IP_3$ -чувствительных в рианодин-чувствительные внутриклеточные депо.

Таким образом, если между различными внутриклеточными депо существует переход кальция в обоих направлениях, то можно предположить, что в растущих ооцитах свиньи переход  $Ca^{2+}$  между внутриклеточными депо происходит только в направлении из  $IP_3$ - в рианодинчувствительные внутриклеточные депо, а завершение стадии роста в ооцитах сопровождается дополнительным переходом  $Ca^{2+}$ , происходящим в обратном направлении.

Возникает вопрос: чем могут быть вызваны различия в направлении перемещения  $Ca^{2+}$  между внутриклеточными депо в растущих и завершивших стадию роста ооцитах свиньи?

Известно, что при использовании растущих ооцитов в клеточных репродуктивных технологиях, в результате их экстракорпорального созревания снижается число яйцеклеток, компетентных к оплодотворению и количество развившихся из них доимплантационных эмбрионов. В завершивших стадию роста ооцитах качество созревания и выход эмбрионов выше, чем при использовании растущих ооцитов (Ericsson et al., 1993). Реинициация мейоза в ооцитах в основном связана с освобождением  $Ca^{2+}$  из  $IP_3$ -чувствительных внутриклеточных депо, так как показано, что инъекция соединений, ингибирующих образование  $IP_3$  или его связывание с рецепторами, вызывает нарушения в ядерно-цитоплазматическом созревании яйцеклетки, в то время, как добавление специфических ингибиторов рианодинчувствительных рецепторов не оказывает отрицательного действия на мейоз в ооцитах (Santella et al., 1999). Так как освобождение  $Ca^{2+}$  из  $IP_3$ -чувствительных депо происходит только в выросших ооцитах, становится понятным, почему выше количество и качество созревших ооцитов при использовании клеток, завершивших стадию роста. Возможно, идентифицированный переход  $Ca^{2+}$  из рианодин- в  $IP_3$ -чувствительные внутриклеточные депо связан с

необходимостью возрастания уровня содержания кальция для мейотического дозревания ооцитов, которое происходит только в завершивших стадию роста ооцитах.

Если  $\text{IP}_3$ -чувствительные депо кальция обеспечивают в клетках прохождение мейоза, то функционирование рианодин-чувствительных депо кальция, вероятно, связано с иными внутриклеточными процессами. Резонно предположить, что одним из таких процессов является ингибирование реинициации мейоза. На ооцитах свиней было показано, что тестостерон ингибирует их спонтанное созревание (Rice, McGaughey, 1981). Однако при совместном действии тестостерон и дбцАМФ проявляется более выраженный эффект ингибирования созревания ооцитов. Также, ранее было показано, что добавление тестостерона в среду инкубации стимулирует дополнительное освобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо при совместном действии пролактина и теофиллина. В присутствии тестостерона дополнительное освобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо способно стимулироваться протеинкиназой А (Денисенко, Кузьмина, 2009б), из чего можно было бы предположить, что активация протеинкиназы А в данном случае способствует переходу  $\text{Ca}^{2+}$  из  $\text{IP}_3$ - в рианодин-чувствительные внутриклеточные депо. В растущих ооцитах свиньи дополнительное освобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо также стимулируется протеинкиназой А, что, возможно, приводит к переходу  $\text{Ca}^{2+}$  из  $\text{IP}_3$ - в рианодин-чувствительное внутриклеточное депо.

Таким образом, отсутствие перехода  $\text{Ca}^{2+}$  из рианодин- в  $\text{IP}_3$ -чувствительные внутриклеточные депо, которое отмечается в растущих ооцитах, возможно, обуславливает ингибирование реинициации мейотического преобразования хроматина в не завершивших цитоплазматическое созревание ооцитах. В то же время, после завершения процессов роста сформировавшийся ооцит становится способным к реинициации мейоза, о чем свидетельствует появление возможности перехода  $\text{Ca}^{2+}$  из рианодин- в  $\text{IP}_3$ -чувствительные внутриклеточные депо. Полученные данные свидетельствуют о различных путях сигнальной трансдукции в ооцитах на завершающих этапах формирования из них зрелых яйцеклеток.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Денисенко В.Ю., Кузьмина Т.И. Влияние ингибирования рианодиновых и  $\text{IP}_3$ -чувствительных рецепторов, а также протеинкиназы С на освобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо ооцитов свиней при их активации пролактином и GTP // Цитология. 2007. Т. 49. № 8. С. 685–689.
- Денисенко В.Ю., Кузьмина Т.И. Влияние теофиллина на внутриклеточный кальций в ооцитах свиней // Сб. науч. трудов ВНИИГРЖ. С.-Петербург. 2009а. С. 103–106.
- Кузьмина Т.И., Денисенко В.Ю. Участие тестостерона в обмене внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  в клетках гранулы свиней // Белоруссия. 2009б. С. 97–99.
- Alm H., Torner H., Lohrke B. et al. Bovine blastocyst development rate in vitro is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity // Theriogen. 2005. V. 63. P. 2194–2205.
- Berridge M.J., Irvine R.F. Inositol phosphates and cell signaling // Nature. 1989. V. 341. P. 197–205.
- Berridge M.J. Calcium signal transduction and cellular control mechanisms // Biochim. Biophys. Acta. 2004. V. 1742. P. 3–7.
- Ericsson S.A., Boice M.L., Funahashi H. et al. Assessment of porcine oocytes using brilliant cresyl blue // Theriogen. 1993. V. 39. P. 214 [abstract].
- 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.
- Machaty Z., Funahashi H., Day B.N. et al. Developmental changes in the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  release mechanisms in porcine oocytes // Biol. Reprod. 1997. V. 56. P. 921–930.
- 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.
- Rice C., McGaughey R.W. Effect of testosterone and dibutyryl cAMP on the spontaneous maturation of pig oocytes // Reprod. Fertil. 1981. V. 62. P. 245–256.
- Roca J., Martinez E., Vazquez J.M. et al. Selection of immature pig oocytes for homologous in vitro penetration assays with the brilliant cresyl blue test // Repr. Fertil. Devel. 1998. V. 10. P. 479–486.
- Santella I., De Riso I., Gragnaniello G. et al. Cortical granule translocation during maturation of starfish oocytes requires cytoskeletal rearrangement triggered by  $\text{InsP}_3$ -mediated  $\text{Ca}^{2+}$  release // Exp. Cell Res. 1999. V. 248. P. 567–574.
- Yue C., White K.I., Reed W.A. et al. The existence of inositol 1,4,5-trisphosphate and ryanodine receptors in mature bovine oocytes // Devel. 1995. V. 121. P. 2645–2654.
- Wassarman M. The mammalian ovum. In: Knobil E., Neil D., eds. The physiology of reproduction, vol. 1. New York, USA: Raven Press, 1988. P. 69–102.

**Ca<sup>2+</sup> Release from Intracellular Stores of Pig Oocytes at Different Stages of Growth****V. Yu. Denisenko and T. I. Kuz'mina**

*All-Russia Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding, Russian Academy of Agricultural Sciences,  
Moskovskoe sh. 55a, Pushkin, St. Petersburg, 196600 Russia  
e-mail: prof.kouzmina@mail.ru*

**Abstract**—Ca<sup>2+</sup> release from intracellular stores of pig oocytes was investigated using the Ca<sup>2+</sup>-sensitive fluorescent dye chlorotetracycline. Oocytes were divided into growing ones and those that completed their growth using brilliant cresyl blue (BCB) staining. The stained oocytes (BCB “+”) were determined as the ones that completed their growth, while the unstained ones (BCB “–”) were determined as those in the final stages of growth. In the BCB “+” and BCB “–” oocytes, prolactin, theophylline, GTP, and GDP cause Ca<sup>2+</sup> to exit intracellular stores. In the oocytes that completed their growth, joint action of prolactin and GTP activates additional release of Ca<sup>2+</sup>, in which protein kinase C takes part. In growing oocytes, joint action of prolactin and GTP does not lead to additional release of Ca<sup>2+</sup>. Joint action of theophylline and GDP in growing oocytes and oocytes that completed the growth stage promotes additional Ca<sup>2+</sup> exit from intracellular stores. This exit is regulated by protein kinase A. The obtained data show that there are various routes of Ca<sup>2+</sup> release from intracellular stores in growing and grown pig oocytes.

*Keywords:* calcium, pig oocytes, BCB