

УДК 591.465.12

ФОЛЛИКУЛЯРНЫЕ КЛЕТКИ ЯИЧНИКА АМФИБИЙ: ПРОИСХОЖДЕНИЕ, СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ

© 2013 г. В. В. Кондукторова^{1,2}, Н. Н. Лучинская¹¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
119991 Москва, Ленинские горы²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН
119991 Москва, Вавилова, 32

E-mail: venir5@mail.ru

Поступила в редакцию 16.10.12 г.

Окончательный вариант получен 07.12.12 г.

Образование фолликулярных оболочек вокруг ооцитов в формирующемся яичнике и последующая их морфологическая дифференцировка идет “рука об руку” со сменой фаз стероидогенеза, блоком мейоза и его поддержанием, созданием условий для вителлогенеза, роста и созревания ооцитов. Обмен метаболитами осуществляется через щелевые контакты и путем рецептор-опосредованного транспорта через периооцитное пространство. Транспорт ионов в фолликулярных клетках (ФК) регулирует потенциал плазматической мембраны, создавая условия для эффективного направленного транспорта через щелевые контакты. Акцепция разнообразных биологически активных веществ фолликулярными клетками является дополнительным рычагом регуляции состояния системы фолликула. В нашем обзоре мы попытались сделать акцент на ФК амфибий, как на ключевых участниках системы фолликула, тем более, что обзоров, собирающих воедино данные о происхождении ФК у амфибий, их морфологии, регуляции роста и развития ооцита, обнаружить не удалось. Современные работы в этой области, как правило, посвящены исследованию молекулярных механизмов регуляции отдельных этапов в ходе развития ооцита. В обзоре описано происхождение и изменение морфологии фолликулярных оболочек в процессе развития ооцита у *Xenopus laevis*, приводятся данные о их регуляторных функциях во время вителлогенеза, об участии в стероидогенезе, процессе поддержания блока мейоза и последующем созревании.

Ключевые слова: амфибии, фолликулярные клетки, оогенез, щелевые контакты, вителлогенез, стероидогенез.

DOI: 10.7868/S0475145013040034

ВОЗНИКНОВЕНИЕ ФОЛЛИКУЛЯРНЫХ КЛЕТОК В РАННЕМ РАЗВИТИИ ООЦИТОВ АМФИБИЙ

Яичники амфибий, так называемые половые валики, удается идентифицировать у шпорцевой лягушки на стадиях метаморфоза (50–54). Это парные органы около 2 мм длиной и 0.7 мм шириной, возникающие как выросты мезентерия на вентральной стороне почки (Ogielska, Kotusz, 2004). В мезентерии могут быть выделены две зоны – медулярный (мезенхимальный) и кортикальный эпителиальный слой, разделенные базальной мембраной (Iwasawa, Yamaguchi, 1984; Tanimura, Iwasawa, 1988; Falconi et al., 2001). Размножение кортикальных клеток приводит к формированию половых валиков, которые заселяются первичными половыми клетками (ППК). У бесхвостых амфибий ППК являются потомками клеток, унаследовавших в процессе дробления уча-

сток цитоплазмы на вегетативном полюсе зиготы, содержащий факторы, определяющие их дальнейшее развитие. Во время гаструляции в составе энтодермы ППК погружаются внутрь зародыша. На стадии хвостовой почки ППК активно мигрируют на дорсальную сторону зародыша к закладке гонады. Там ППК начинают интенсивно делиться митотически, давая начало многочисленным первичным оогониям. Клетки медулярного слоя, размножаясь, врастают в центральную часть полового валика между эпителиальными клетками. Оогонии, вступившие на путь дифференцировки, претерпевают четыре последовательных митотических деления, в результате которых образуется кластер из 16 цистоцитов, связанных между собой межклеточными мостиками, который называется цистой или гнездом. Каждый цистоцит имеет грушевидную форму, направлен узким концом к центру цисты и уже имеет первые признаки будущей

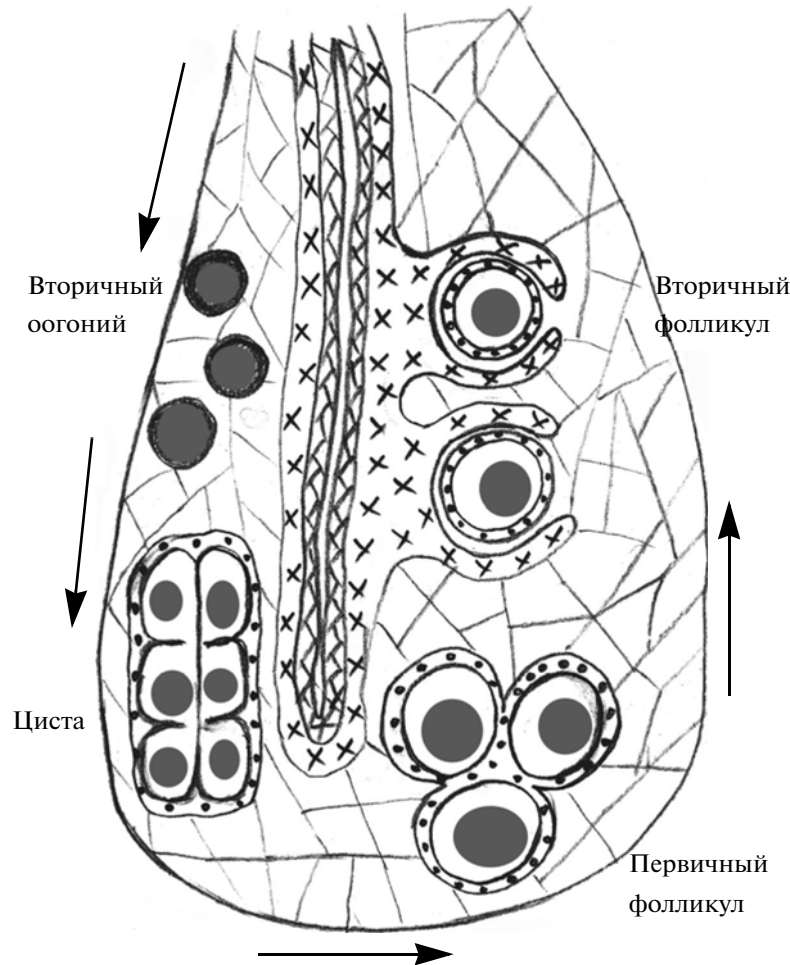


Рис. 1. Последовательные этапы формирования оболочек ооцита в яичнике шпорцевой лягушки на ст. 62–66.

анимально-вегетативной полярности ооцита (Kloc et al., 2004). У шпорцевой лягушки 16-клеточная циста входит в профазу первого мейотического деления. Стадии первой мейотической профазы цистоциты в яичнике лягушонка проходят синхронно (Kloc et al., 2004). Эпителиальные клетки кортекса окружают гнезда и отдельные цистоциты, образуя префолликулярные оболочки (Ogielska, Kotusz, 2004) (рис. 1). К поздней пахитене ооциты отделяются друг от друга префолликулярными клетками и теряют связь через цитоплазматические мостики. Дальнейшее развитие первичных фолликулов происходит асинхронно (Coggins, 1973).

У *Xenopus* каждый из 16 цистоцитов дает начало ооциту, в отличие от млекопитающих, где на мыши было показано, что лишь 33% всех ооцитов выживают и формируют первичные фолликулы (Pepling, Spradling, 2001), а прочие претерпевают апоптоз. Апоптотические клетки были обнаружены в кортикальной зоне яичника шпорцевой ля-

гушки, и они располагались вне цист (Kloc et al., 2004). Предположительно, апоптозу подвержены префолликулярные клетки.

Мезенхимальные клетки яичника формируют теку – соединительно-тканый слой вокруг первичных фолликулов. Так называемый вторичный фолликул содержит ооцит, покрытый оболочками соматического происхождения: где ФК являются производными эпителиального компартмента яичника, а клетки теки – мезенхимального (Wallace, Selman, 1990; Ogielska, Kotusz, 2004). После формирования оболочек ооцита наступает блок мейоза на стадии диплотены. Гормональная регуляция этого этапа у амфибий не изучена. При исследовании процесса формирования фолликулов во фрагментах яичника теленка *in vitro* было отмечено, что блок мейоза не наступал, пока не были сформированы оболочки (Fortune et al., 2011).

Факторы, определяющие переход ооцитов к дальнейшему росту, также известны только для млекопитающих (см. обзоры: Buratini, Price, 2011;

Jagarlamudi, Rajkovic, 2012; Kim, 2012; Matsuda et al., 2012). Рост ооцита определяется взаимодействием сигнальных путей ряда факторов, таких как FGFs, Kit-лиганд, NGF, BMPs, PDGF, TGFs и других, синтезируемых клетками гранулезы (ФК) и самим ооцитом. Связывание с лигандами рецепторных тирозиновых протеинкиназ (RPTK), ключевой из которых является Kit, вызывает активацию сигнального пути фосфатидилинозитол-3-киназа (PI3K)–Akt. Фосфорилирование Akt приводит к подавлению активности ингибиторных молекул ооцита (FOXO, PTEN, AMN и др.), препятствующих началу роста фолликула. Таким образом, ФК в яичнике млекопитающих и, по-видимому, низших позвоночных принадлежит важнейшая роль в регуляции перехода к стадии роста.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПРЕОБРАЗОВАНИЯ ФОЛЛИКУЛЯРНЫХ КЛЕТОК В ПРОЦЕССЕ РОСТА ФОЛЛИКУЛОВ

Морфологическая структура клеток в фолликуле является отражением идущих здесь молекулярных процессов и метаболической кооперации между ооцитом и окружающими клетками. Развитие ооцитов шпорцевой лягушки условно разделяют на 6 стадий (Dumont, 1972).

На стадии I в начале цитоплазматического роста (диаметр 0.05–0.3 мм), уплощенные ФК тесно соприкасаются с плазматической мембраной ооцита. Между собой ФК соединяются адгезионными контактами и десмосомами (Dumont, Brummett, 1978; Wallace, Selman, 1990). К концу I стадии ооцит и ФК формируют навстречу друг другу цитоплазматические выросты, и ФК приподнимаются над поверхностью ооцита, формируется периооцитное пространство. Между ооцитом и ФК формируются неспециализированные контактные зоны с расстоянием между мембранами 20 нм и более (Browne, Werner, 1984). Наличие щелевых контактов (ЩК) на этой стадии достоверно не установлено.

На стадии II (0.3–0.45 мм) в теке увеличивается количество коллагена, а слой ФК утолщается. Количество и длина микровилли на поверхности ооцита растет, при этом плазматическая мембрана образует эндоцитозные инвагинации между выростами. Микровилли и инвагинации значительно увеличивают площадь поверхности ооцита. ФК утолщаются, и на их поверхности, обращенной к ооциту, формируются макровилли, в количестве 50–70 штук на клетку (наши неопубликованные данные). В результате слой ФК приобретает арочный вид. Морфологически между ооцитом и ФК впервые удается идентифицировать ЩК (Browne, Werner, 1984), создается основа для прямой метабо-

лической кооперации. В периооцитном пространстве островками начинает формироваться желточная (вителлиновая) оболочка (Dumont, 1972). По современным данным, в состав желточной оболочки амфибий входят 6 (возможно, 7) различающихся по молекулярной массе гликопротеинов со сходной доменной структурой входящих в них белков (Harris et al., 1994; Hedric, 2008). Различными методами было показано, что компоненты оболочки у амфибий синтезируются ооцитом (Yamaguchi et al., 1989; Yang, Hedrick, 1997; Kubo et al., 2000), тогда как у костистых рыб в состав желточной оболочки входит белок, синтез которого индуцирован эстрогеном в печени (Hamazaki et al., 1987). Синтез компонентов желточной оболочки в ФК до сего времени не показан.

У некоторых амфибий на превителлогенных стадиях была обнаружена гетерогенность ФК. У рогатки Кранвелла (*Ceratophrys cranwelli*) различают светлые и более крупные темные ФК, ультраструктура которых указывает на высокую синтетическую активность. Цитоплазма включает большое количество свободных рибосом и шероховатого эндоплазматического ретикулума, скопления гликогена и везикулы с электронно-плотными частицами (Villicco et al., 2007).

При исследовании фолликулов у червяг *Ichthyophis tricolor* и *Gegeneophis ramaswamii* (Beyo et al., 2007) авторы разделили ФК на темные и светлые, основываясь, прежде всего, на структуре хроматина. В ядрах темных клеток хроматин находится преимущественно в неактивном конденсированном состоянии, в отличие от светлых клеток с деконденсированным эухроматином. С развитием ооцита все ФК становятся темными. Эта гетерогенность ФК у некоторых амфибий, по-видимому, связана с различиями в их синтетической активности.

На стадии III (0.45–0.6 мм) тека прорастает кровеносными сосудами, и ооцит активно акцептирует и аккумулирует желток. ФК увеличиваются в объеме. Желточная оболочка к этой стадии образует непрерывный слой в периооцитном пространстве. Микро- и макровилли пронизывают ее, сохраняя прямые контакты ооцита и ФК.

К стадии IV (0.6–1 мм) (рис. 2) скорость вителлогенеза достигает своего максимума. Ооциты этой стадии покрыты хорошо развитой сетью сосудов. Объем ФК продолжает расти, увеличивается объем ядра и ядрышка, что указывает на рост синтетической активности в них. С ростом ооцита на стадиях IV–V (1–1.2 мм) между ФК возникают промежутки, адгезионные контакты сохраняются на выростах ФК (рис. 3). Трансэпителиальные каналы позволяют свободно проходить вителлогенину (ВГ) и другим макромолекулам из капиллярной

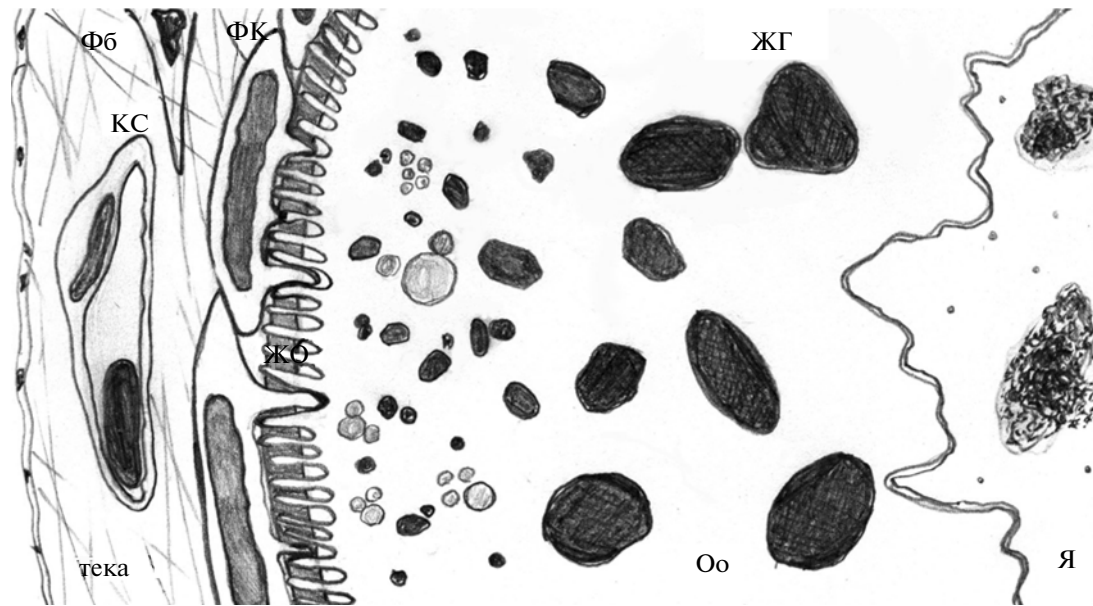


Рис. 2. Схема строения фолликула на ст. IV. Оо – ооцит; ФК – фолликулярные клетки; КС – кровеносный сосуд; Фб – фибробласт; Я – ядро; ЖГ – желточные гранулы; ЖО – желточная оболочка.

сети к ооциту. Желточная оболочка достигает к этой стадии своей максимальной толщины, при этом многочисленные ЩК между отростками ооцита и ФК сохраняются.

К стадии VI (1–1.3 мм) вителлогенез завершается. Микро- и макровиллы заметно деградируют. Слой ФК становится тоньше. На этой стадии количество ФК достигает 10–14 тысяч на ооцит, а плотность составляет примерно 32 на 10000 μm^2 поверхности ооцита шпорцевой лягушки (Miledi, Woodward, 1989).

Ультраструктура ФК зрелых ооцитов амфибий была исследована в ряде работ (Dumont, Brummett, 1978; Browne, Werner, 1984; Hsü et al., 1985, Vilecco et al., 2007 и др.). Митохондрии в ФК имеют трубчатую форму. Комплекс Гольджи хорошо развит и часто расположен группами вблизи ядра. Шероховатый эндоплазматический ретикулум с рибосомами обычно выглядит как несколько коротких сегментов. В клетках много гладкого эндоплазматического ретикулума. В цитоплазме есть жировые капли, которые могут содержать электронноплотные включения. Имеются многочисленные везикулы как в цитоплазме, так и открывающиеся наружу, а также мультивезикулярные тельца. Все перечисленное характерно для клеток, синтезирующих стероидные гормоны.

Изменения в морфологической структуре фолликулов на превителлогенных, вителлогенных стадиях и в процессе созревания коррелирует с моле-

кулярными процессами, идущими в ооците, ФК и теке и отражают их взаимное влияние.

ЩЕЛЕВЫЕ КОНТАКТЫ ООЦИТА И ФОЛЛИКУЛЯРНЫХ КЛЕТОК

Через ЩК на микровиллах ооцита и макровиллах ФК осуществляется прямая метаболическая кооперация и селективный направленный транспорт веществ. ЩК между ооцитом и ФК играют важнейшую роль в процессе роста ооцита, поддержании блока мейоза и последующем созревании.

Функциональной единицей ЩК является коннексон – кластер, состоящий из 6 белков коннексинов. У шпорцевой лягушки исследовано пока лишь 9 коннексинов (против 20 у млекопитающих). Их названия соответствуют предсказанной молекулярной массе: Сх28.6, Сх29, Сх30, Сх31, Сх38, Сх40.4, Сх41, Сх43 и Сх43.4 (Gimlich et al., 1990; Yoshizaki, Patiño, 1995; Landesman et al., 2003; De Boer et al., 2005a; De Boer et al., 2006). Основываясь на их нуклеотидной последовательности, коннексины можно разделить на α -группу (Сх38, Сх40.4, Сх41, Сх43), β -группу (Сх28.6; Сх29; Сх30, Сх31) и неспецифическую (Сх43.4). Коннексины Сх31, Сх41, Сх43 и Сх43.4 *Xenopus* являются ортологами хорошо изученных коннексинов Сх31, Сх37, Сх43 и Сх45 млекопитающих соответственно (Landesman et al., 2003; de Boer et al., 2005a). Сх38 является уникальным коннексином *Xenopus*, не имея сходства больше 38% ни с одним из коннексинов мыши и *Danio*. Идентифицированы, но

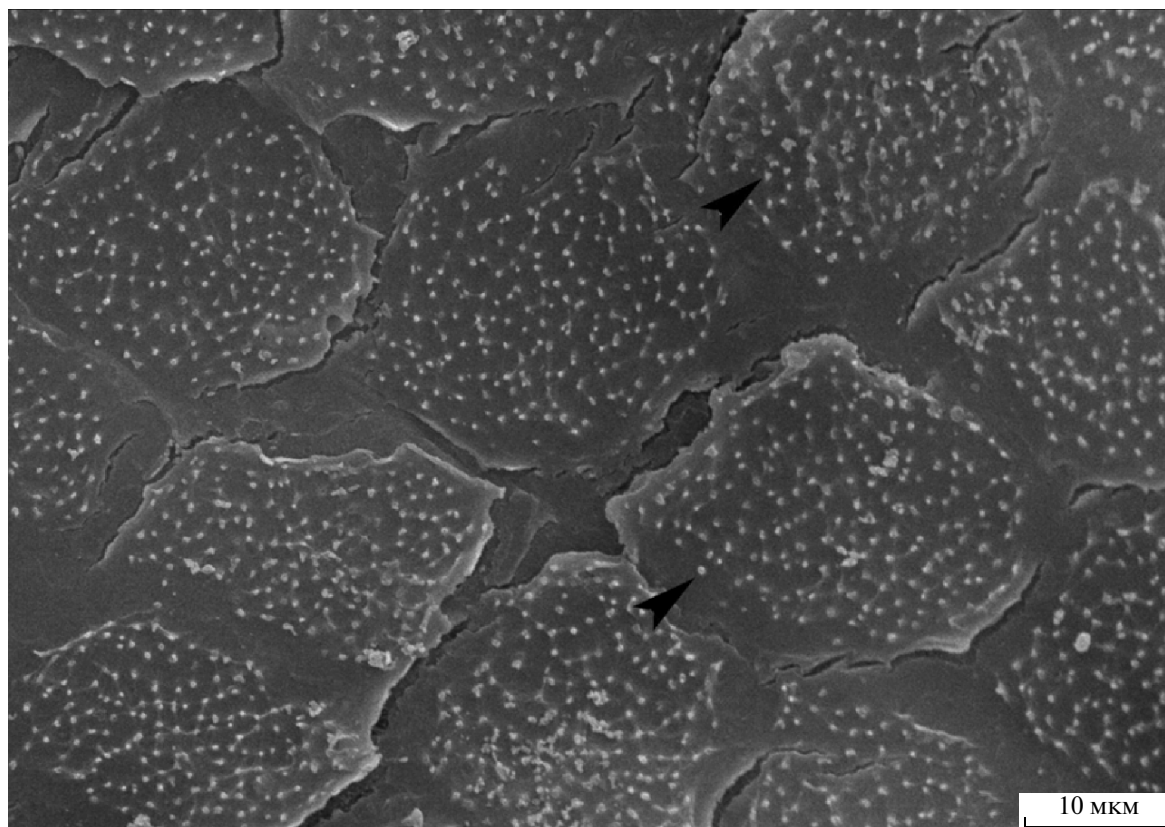


Рис. 3. Слой фолликулярных клеток. Стрелками указаны макровиллы на поверхности клеток, обращенной к ооциту.

неохарактеризованы Сх25, Сх26, а также часть последовательности Сх50 (De Boer, Van der Heyden, 2005b).

В ооцитах методом ПЦР обнаружена мРНК четырех коннексинов — Сх31, Сх38, Сх43 и Сх43.4 (Gimlich et al., 1990; Yoshizaki, Patiño, 1995; Landesman et al., 2003). мРНК Сх38 обнаружена в значительных количествах в ооцитах. В зрелых яйцах ее количество в анимальном и вегетативном полушариях равны. Интересно, что Сх38 для формирования каналов чаще образует гетеротипические пары с Сх43, чем гомотипические (Swenson et al., 1989). После оплодотворения яйца содержание мРНК Сх38 в нем резко падает, а подавление трансляции гена не нарушает развития зародышей. Это дает основание полагать, что свою функцию Сх38 осуществляет во время оогенеза.

Большое исследование экспрессии коннексинов методом иммуногистохимии было выполнено на яичнике мыши. Было показано, что коннексины контактов ооцита с клетками гранулезы и коннексины теки принадлежат подсемейству β (Сх32 и Сх26), тогда как контакты между клетками гранулезы образованы коннексинами подсемейства α (Сх43, Сх37 и Сх45) (Wright et al., 2001). В ооцитах

Сх37 в данной работе обнаружен не был. Позже было показано, что Сх37 в ооцитах присутствует и образует гомотипические контакты ооцит-гранулеза (Veitch et al., 2004). Какие коннексины в клетках гранулезы являются гетеротипическими партнерами коннексинов ооцита Сх26 и Сх32, или они образуют гемиконнексоны, и какова их физиологическая роль остается невыясненным.

У *Xenopus* ортологом Сх37 млекопитающих, формирующего ЩК ооцит-гранулеза, является Сх41, экспрессия которого в ооцитах отсутствует (Landesman et al., 2003). Сх41 в настоящее время единственный известный коннексин ФК амфибий, формирующий ЩК между ними. Сх41, возможно, участвует в формировании гетеротипических контактов с участием коннексинов Сх31, Сх38, Сх43 и Сх43.4 ооцита. Наиболее вероятным кандидатом является Сх38, экспрессия которого в ооцитах выше других.

Долго считалось, что проницаемость канала определяется размером поры, образуемой коннексином, и через нее могут проходить вещества с молекулярным весом до 2 кДа. Позже обнаружилось, что ЩК обладают высокой селективностью по отношению к биологически значимым нуклеотидам,

аминокислотам, сахарам и различным ионам (см. обзор Harris, 2007). В 2005 г. Вальюнас с коллегами на клетках млекопитающих показали возможность прохождения siRNA массой около 2–4 кДа через ЩК, причем siRNA проходила только через контакты, образованные Cx43, но не Cx32 или Cx26 (Valiunas et al., 2005). Недавно было показано, что небольшие пептиды с массой 1.8 кДа могут проходить через ЩК, если позволяет их 3D структура (Neijssen et al., 2005). В этом же году была опубликована статья, ломающая представления о размере молекул, способных проходить через ЩК. Была доказана способность кальмодулина размером 17 кДа проходить через ЩК из ооцита в ФК шпорцевой лягушки (Curran, Woodruff, 2007). Позже такая возможность была показана для тропонина размером 18 кДа (Cieniewicz, Woodruff, 2010). Авторы высказывают предположение, что этому способствует фибриллярная трехмерная структура этих белков. Возможно список белков, способных проникать через ЩК, будет расширен. Транспорт в противоположном направлении из ФК в ооцит до настоящего времени не показан ввиду методических трудностей.

У *Xenopus* также обнаружены паннексины PANX1 и PANX2. Паннексины сходны с иннексинами, формирующими ЩК у беспозвоночных и имеют топологию подобную коннексинам (Panchin, 2005). PANX1 был найден среди EST клонов, полученных из ооцитов (de Boer, van der Neuden, 2005b). Многочисленные исследования паннексинов последнего времени у позвоночных позволяют считать, что ЩК они не формируют, а образуют поры на плазматической мембране для пара- и аутокринной регуляции (Sosinsky et al., 2011). Роль паннексинов в оогенезе не изучена.

УЧАСТИЕ ФОЛЛИКУЛЯРНЫХ КЛЕТОК В ВИТЕЛЛОГЕНЕЗЕ

Большинство амфибий продуцирует большое количество яиц, богатых желтком. Размер развивающихся ооцитов коррелирует с количеством запасаемого желтка. Процесс аккумуляции желтка, т.н. вителлогенез, является важным этапом развития ооцита амфибий. Желток является главным источником питательных веществ для развивающегося эмбриона вплоть до начала активного питания личинки.

Предшественники желтка можно разделить на несколько типов на основании места их синтеза и пути аккумуляции в гранулы. Основным предшественником желтка у амфибий являются вителлогенины, которые представляют собой мультидоменные липопротеины, которые у *Xenopus* кодируются четырьмя генами (A1, A2, B1, B2) с высокой гомологией. (Willey, Wallace, 1981; Wahli et al., 1982;

Gerber-Huber et al., 1987; Wallace et al., 1990; Yoshitome et al., 2003).

В ответ на выделяемые гипофизом гонадотропины фолликулостимулирующий и лютеинизирующий гормоны (ФСГ и ЛГ) фолликулы начинают продуцировать эстрадиол-17 β (E₂) (Redshaw, 1972; Polzonetti-Magni et al., 1998). E₂ стимулирует синтез ВГ клетками печени. Максимальной способностью к синтезу E₂ обладают вителлогенные фолликулы (Fortune, 1983). При развитии фолликула от стадии IV к стадии VI продукция E₂ снижается в 10–30 раз. Синтез гормона в изолированных фолликулярных оболочках ооцитов этих же стадий снижается только в 4 раза. Таким образом, ведущая роль в синтезе эстрадиола-17 β и стимуляции выработки ВГ принадлежит самому ооциту (Stretarugsa, Wallace, 1997).

ВГ транспортируется с кровотоком в яичник и интернализуется растущими ооцитами (Wallace, Dumont, 1968; Wallace et al., 1973; Varriale, 1988). Ранее считалось, что накопление ВГ в ооцитах начинается в конце стадии II–начале стадии III (диаметр 0.45 мм), когда становятся видны первые желточные гранулы. Однако накопление желточных белков начинается раньше, на стадиях, которые считались превителлогенными (O'Brien et al., 2010).

Чтобы попасть в ооцит, ВГ должен последовательно преодолеть несколько барьеров: эндотелий сосудов, соединительнотканную теку, базальную мембрану, ФК и, наконец, желточную оболочку. Полагают, что путь ВГ через перечисленные преграды к поверхности ооцита осуществляется по межклеточным пространствам, порам и каналам, а затем посредством рецептор-опосредованного пиноцитоза и эндоцитоза ВГ поглощается ооцитом (Opresko, Wiley, 1987; Wallace, Selman, 1990; Stifani et al., 1990). Внутри ооцита ВГ протеолитически расщепляются в эндосомах на липовителлины с высокой и низкой молекулярной массой (LvH и LvL), фосвитины (Pv) и фактор Виллебранда типа Д (vWFD), формируя первичные желточные гранулы (Opresko et al., 1980; Buschiazzo et al., 2003; Finn, 2007).

Во время оогенеза сам ооцит также синтезирует белки, жиры и углеводы. Полагают, что липиды начинают синтезироваться ооцитом еще на превителлогенной стадии. Уже на II стадии наблюдается скопление мелких липидных везикул вокруг ядра. Полисахариды запасаются ооцитом в виде гликогена и нейтральных мукополисахаридов в поверхностном слое желточных гранул (Albanese-Carmignani, Zaccone, 1977). Синтез гликогена в ооцитах может осуществляться прямым (через UDP-глюкозу) и непрямым (через молочную кислоту) путем (Kessi et al., 1996; Preller et al., 2007).

По оценке Опреско и Вили, 80–90% тотального белка зрелых ооцитов происходит из ВГ, получаемого с кровотоком, а прочие 10–20% белка синтезируются ооцитом (Oprea, Wiley, 1987). В состав липидной фракции желтка существенный вклад вносят ФК (Uribe, 2003). У закончивших рост ооцитов *Bufo arenarum* липидная фракция содержит, главным образом, фосфолипиды (фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин), ненасыщенные фосфолипиды, триацилглицеролы, полярные и нейтральные липиды (Buschiazzi et al., 2003; Buschiazzi, Alonso, 2005). Суммарное количество липидов увеличивается вдвое к стадии IV по сравнению со стадией III (Bruzzone et al., 2003).

Молекулярные каскады, задействованные в регуляции вителлогенеза, до конца не ясны. Поскольку яичник амфибий одновременно содержит ооциты разных стадий развития, т.е. в одном и том же гормональном окружении захват и накопление желтка осуществляется только ограниченной популяцией ооцитов, то можно предположить, что сигнал, регулирующий вителлогенез, должен иметь локальный характер. Монако с соавторами показал, что разобщение ЩК с помощью октанола у *Xenopus* приводит к торможению процесса вителлогенеза (Monaco, 2007). Исследование динамики экспрессии овариальных коннексинов с помощью ОТ-ПЦР показало, что Sx43 начинает экспрессироваться со стадии II и его экспрессия нарастает по мере роста ооцита, однако его функция однозначно не установлена. На *X. laevis* было показано, что для индукции и поддержания вителлогенеза необходим перенос цАМФ из ФК в ооцит через ЩК. Нарушение связности клеток октанолам или ингибитором кальмодулина, регулирующим проницаемость ЩК, приводит к остановке вителлогенеза (Luque et al., 2011). Добавление в среду дбцАМФ полностью восстанавливает процесс интернализации ВГ. Таким образом, ФК играют ключевую роль в вителлогенезе.

РОЛЬ ФОЛЛИКУЛЯРНЫХ КЛЕТОК В СТЕРОИДОГЕНЕЗЕ И СОЗРЕВАНИИ

Участие в стероидогенезе — это важнейшая функция фолликулярного эпителия в процессе роста и созревания ооцита. С наступлением периода размножения повышается уровень гонадотропных гормонов гипофиза. Уровень ФСГ значителен в период роста ооцитов, тогда как уровень ЛГ повышается в период их созревания. Рецепторы к ФСГ и ЛГ (ФСГР и ЛГР) у амфибий пока не клонированы, однако, клонированы у рыб различных таксонов в связи с их большой практической значимостью для рыбоводства. Было показано, что ФСГР и ЛГР рыб являются рецепторами, сопряженными с гетеротримерными ГТФ-связывающими белками

(GPCR) (Ascoli et al., 2002; Smits et al., 2003). ФСГР обнаружены на клетках гранулезы (фолликулярных клетках) и теки, тогда как рецепторы к ЛГ обнаружены только на ФК. Рецепторы к гонадотропным гормонам в ооцитах не обнаружены (Miwa et al., 1994). По-видимому, это верно и для амфибий, поскольку исследования показывают, что ЛГ стимулирует созревание фолликулов, но не ооцитов без оболочек. ФСГР с одинаковой эффективностью связывает как ФСГ, так и ЛГ, тогда как ЛГР связывается только с ЛГ и обладает высокой видоспецифичностью (Oba et al., 1999 a, b).

Под действием ФСГ и ЛГ ФК продуцируют прогестерон (Pg) (рис. 4), а клетки теки — андрогены (Kwon, Ahn, 1994; Sretarugsa, Wallace, 1997; Ahn et al., 1999). Проникая в ооцит, Pg может преобразовываться в андрогены с участием 17-гидроксилазы (Сур 17), которая экспрессируется исключительно в ооцитах (Thiber-Fouchet et al., 1976; Mulner et al., 1978; Yang et al., 2003). Андрогены андростендион и тестостерон далее могут преобразовываться в эстрон и эстрадиол-17β (E₂) в результате реакции с участием изоформы цитохрома P-450 ароматазы (Gohin et al., 2011). E₂ является ключевым гормоном в индукции вителлогенеза и модуляции процесса созревания ооцитов. Ароматаза экспрессируется вителлогенными ооцитами и ФК на этих стадиях. При этом суммарная активность фермента в ФК выше, чем в ооците более чем в 2 раза. Экспрессия ароматазы и ее активность резко падают в позднем оогенезе (стадия VI). Таким образом, как ооциты средних размеров, так и их ФК способны продуцировать E₂ из андрогенов. Наличие в ооцитах Сур 17 и ароматазы позволяет синтезировать E₂ из Pg (Gohin et al., 2011). Просуществовавшая почти 20 лет двухкомпонентная модель регуляции синтеза E₂ в яичнике (тека и ФК) была дополнена третьим участником — ооцитом. Возможно, существует взаимодействие между ооцитом и его соматическими компартментами, направленное на регуляцию продукции E₂.

Рецепторы к E₂ обнаружены в фолликулах и ооцитах на вителлогенной и поствителлогенной стадиях (IV и VI стадии), и уровень их мРНК остается стабильным в период позднего вителлогенеза и созревания. Ингибиторный эффект E₂ на созревание опосредован ФК. Показано, что эстрадиол препятствует в ФК превращению прегненолона в Pg под действием гонадотропных гормонов (Lin et al., 1988; Gohin et al., 2011).

В исследованиях процессов созревания *in vitro* в качестве индуктора часто используется Pg. Однако радиоиммунологический метод не выявил повышения уровня стероидных гормонов ни в яичнике, ни в сыворотке самок *X. laevis in vivo*, ни во фрагментах яичников *in vitro* после индукции хориони-

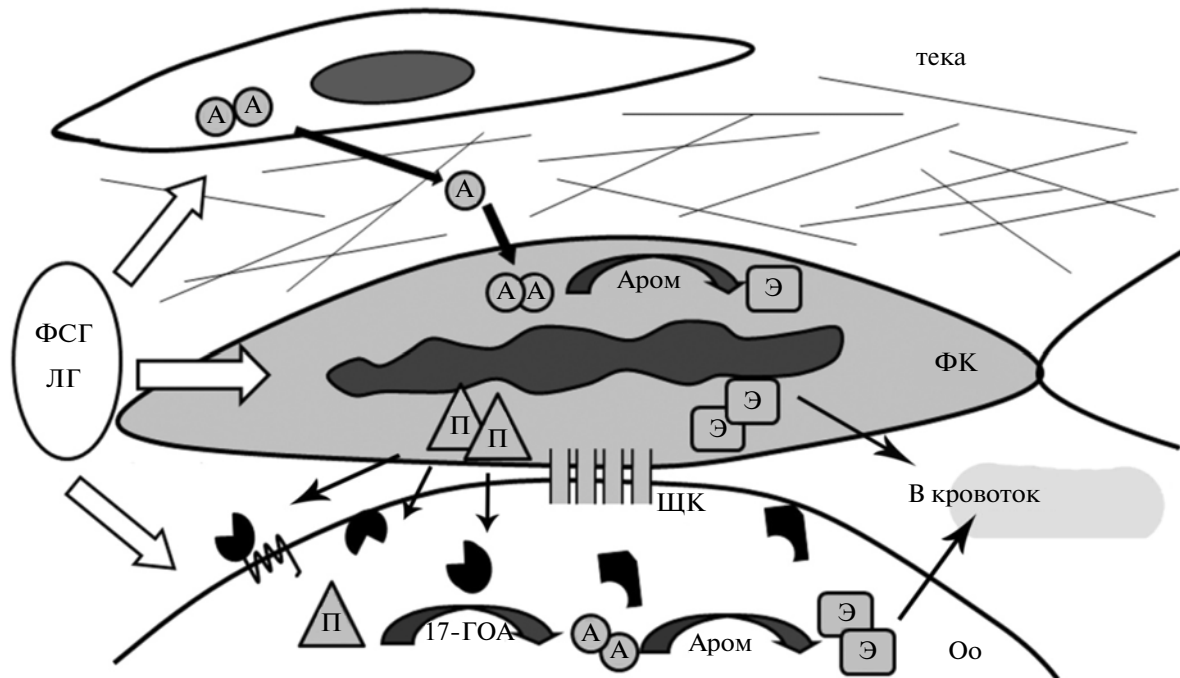


Рис. 4. Схема синтеза стероидов в яичнике амфибий. В процессе вителлогенеза в ответ на гонадотропные гормоны ФСГ и ЛГ клетки теки продуцируют андрогены, ФК — прогестерон. Андрогены теки проникают в фолликулярные клетки, где с участием ароматазы превращаются в эстрадиол-17β. Прогестерон ФК, поступив в ооцит, превращается в андрогены, а затем в эстрадиол-17β, который вызывает синтез вителлогенина в печени. Перед созреванием ЛГ и ФСГ вызывают продукцию прогестерона в ФК и андрогенов в клетках теки. Прогестерон в ооците частично превращается в андрогены. Прогестерон и андрогены связываются со своими рецепторами в ооците, запуская процесс созревания. А — андрогены, Э — эстрадиол-17β, П — прогестерон, Аром — ароматаза, 17-ГОА — 17-гидроксилаза, — мембранный и цитоплазматический рецепторы к прогестерону; — мембранный и цитоплазматический рецептор к андрогенам; Оо — ооцит, ФК — фолликулярная клетка, ЩК — щелевой контакт.

ческим гонадотропином человека (ХГЧ). Уровень Пг сохранялся на границе детекции метода, тогда как уровни андрогенов — андростендиона и тестостерона повышались более, чем в 10 раз (Fortune, 1983; el-Zein et al., 1988; Lutz et al., 2001). Кроме того, ингибирование синтеза андрогенов приводит к задержке овуляции (White et al., 2005), тогда как модуляция количества классического рецептора к Пг и его активности влияет на созревание ооцитов, индуцированное Пг, незначительно (Вауаа et al., 2000; Tian et al., 2000). Совокупность этих данных позволили ряду авторов заключить, что андрогенам, а не Пг, принадлежит ведущая роль при созревании *in vivo* (Evaul et al., 2007). Однако в работе Хаккарда с коллегами методом газовой хроматографии с масс-спектрометрией рост количества Пг в ооцитах в 30–40 раз после стимуляции лютеинизирующим гормоном был достоверно показан (Naccard et al., 2012). Хотя эффективная концентрация тестостерона для созревания *in vitro* ооцитов без оболочек ниже в 10 раз эффективной кон-

центрации прогестерона, после стимуляции ЛГ уровень Пг достигал своего максимального значения (100 нМ) уже через час, тогда как концентрация андрогенов нарастала медленно. Таким образом, Пг является первым, а потому, по-видимому, главным стероидом, который продуцируется ФК в ответ на ЛГ.

Наличие фолликулярных оболочек снижает эффективность действия внешнего тестостерона и Пг на два порядка (Naccard et al., 2012). Таким образом, фолликулярный слой может служить барьером для проникновения гормонов к ооциту и ингибировать индукцию созревания внешними свободными стероидами (Mulner, Ozon 1981; Patino, Purkiss, 1993; Naccard et al., 2012). При воздействии низких концентраций Пг (0.25–1 мкг/мл) на фолликул гормон, по-видимому, связывается ФК и не достигает поверхности ооцита. Однако, созревание ооцитов происходит с участием фактора нестероидной природы, синтезируемого ФК и про-

никающего в ооцит через ЩК (Скоблина, 2003; Скоблина, 2004).

Методом газовой хроматографии с масс-спектрометрией также обнаружены сульфатированные водорастворимые формы прегненолона и дегидроэпиандростерона (ДГЭА-С) в зрелых и стимулированных к созреванию ооцитах, причем количество ДГЭА-С значительно превосходило содержание всех прочих стероидов в фолликуле и ооците (Nascard et al., 2012). Авторам не удалось обнаружить сульфотрансферазной активности в ооцитах, а потому, по-видимому, фермент локализован в ФК. Сульфатированные водорастворимые формы могут проникать в ооцит через ЩК. Существенной сульфатазной активности в ооцитах обнаружено не было. При инъекции в ооцит сульфатированная форма ДГЭА-С не вызывала созревания и не влияла на созревание под действием Пг и тестостерона. Полагают, что превращение гормонов в ФК в неактивные сульфатированные формы может являться защитной системой от гормональных флюктуаций и преждевременного созревания ооцитов.

В ооцитах был идентифицирован классический рецептор к андрогенам (АР) регулирующий тестостерон-опосредованное созревание (Lutz et al., 2001). Снижение экспрессии рецептора, а также инкубация с антагонистом подавляет созревание ооцитов и активацию киназ. Выяснилось, что 5% рецептора локализуется у поверхности ооцита, и, возможно, отвечают за негеномные эффекты андрогенов (Lutz et al., 2001; Lutz et al., 2003). Пг связывается с АР с той же аффинностью, что и со своим рецептором (Evaul et al., 2007).

У *Xenopus* также идентифицированы 2 формы классического рецептора к прогестерону ПгР1 и ПгР2, транскрибируемые с одного гена (Вауа et al., 2000; Tian et al., 2000; Liu et al., 2005). В ооците экспрессируются обе формы рецептора, хотя уровень мРНК и белка ПгР1 в ооците низкий (Martinez et al., 2006). Часть ПгР1 локализуется на мембране с участием лиганд-связывающего домена (Martinez et al., 2007). В ФК обнаружен только ПгР1 (Liu et al., 2005). Физиологическая роль ПгР в ФК не ясна. Оверэкспрессия ПгР1 в ооцитах значительно ускоряет созревание, индуцированное прогестероном, а инъекция антисмыслового олигонуклеотида против ПгР1 практически полностью блокирует (Tian et al., 2000). При индукции созревания прогестероном ПгР1 в ФК деградирует по убиквитинному пути, тогда как ПгР2 в ооците фосфорилируется (Liu et al., 2005).

В последние годы у позвоночных обнаружено большое семейство рецепторов к Пг (13 или более), относящихся к суперсемейству GPCR (рецепторов, связанных с гетеротримерными ГТФ-

связывающими белками) (Zhu et al., 2003). У шпорцевой лягушки обнаружен только один белок mPR β из этого семейства с мембранной локализацией (Zhu et al., 2003). Инъекция антител против mPR β в ооциты ингибирует созревание как под действием Пг, так и тестостерона (Josefsberg et al., 2007).

Общепринято, что в поддержании блока мейоза у позвоночных ведущая роль принадлежит цАМФ (Racowsky, 1984; Dekel et al., 1988). Снижение внутриклеточного уровня цАМФ является необходимым условием созревания (Dekel, Beers, 1978; Villecco et al., 2000; Conti et al., 2002). Однако, является ли это единственным условием для начала созревания по-прежнему обсуждается. Долгое время оставалось неизвестным, как достигается и поддерживается высокая концентрация цАМФ в ооците. Выяснилось, у *Xenopus* в активации аденилатциклазы участвуют обе субъединицы G α_s и G $\beta\gamma$ гетеротримерного G-белка, которые постоянно активны в растущем ооците. Ингибирование какой-либо из субъединиц усиливает стероид-индуцированное созревание (Gallo et al., 1995; Sheng et al., 2001; Sheng et al., 2005). Своей активностью субъединицы обязаны мембранному рецептору GPR3 семейства GPCR, конститутивно активному без лиганда (Deng et al., 2008; Rios-Cardona et al., 2008; Mehlmann et al., 2004; Mehlmann, 2005). При индукции созревания ХГЧ рецептор GPR3 протеолитически расщепляется металлопротеиназой (Deng et al., 2008), и активность аденилатциклазы резко падает. Однако, этого недостаточно для созревания ооцитов, что указывает на существование альтернативного пути поддержания мейотической блокады, а главным пусковым механизмом созревания у шпорцевой лягушки *in vivo* все же являются стероиды.

ФК также участвуют в поддержании блока мейоза. У некоторых представителей хвостатых и бесхвостых амфибий, в том числе у шпорцевой лягушки, удаление слоя ФК вызывает спонтанное созревание у закончивших рост ооцитов, собранных в репродуктивный период (Vilain et al., 1980; Kwon et al., 1989; Zelarayán et al., 1995). Высокий уровень фосфолипидов (фосфатидилхолина и фосфатидилинозитола) и вторичных посредников (диацилглицерола и инозитолтрифосфата) в цитоплазме таких ооцитов позволяет им созревать просто в отсутствие ингибиторов из ФК (например, цАМФ) при разобщении ЩК. У *Bufo arenarum* при этом активируется G α_i , подавляющая аденилатциклазу и протеинкиназу А (Zelarayán et al., 2012).

ПРОЧИЕ ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ
НА ПРОЦЕСС СОЗРЕВАНИЯ

Созревание ооцитов *in vitro* возможно с помощью инсулина (El-Etr et al., 1979), а также инсулин подобного фактора роста 1 (insulin-like growth factor 1, IGF-1) (Maller et al., 1981). На *Xenopus* с помощью биохимических и иммунофлюоресцентных методов рецептор α IGF-1R к IGF-1 и инсулину был обнаружен как в ооцитах, так и в ФК (Sadler et al., 2010). Связывание лигандов с рецептором к IGF-1 приводит к активации каскада фосфоинозитол-3-киназа – протеинкиназа Akt – фосфодиэстераза 3, что приводит к снижению уровня цАМФ (Andersen et al., 2003). При удалении фолликулярных оболочек созревание ооцитов, стимулированное действием IGF-1, снижается на 26%, что говорит о вспомогательной роли фолликулярных оболочек. На клетках млекопитающих *in vitro* было показано, что IGF-1 стимулирует стероидогенез в клетках гранулезы (Adashi et al., 1985). У шпорцевой лягушки в присутствии ингибиторов стероидогенеза цианокетона и аминоглутетимида индукция созревания ооцитов инсулином не нарушалась. (El-Etr et al., 1980; Sadler et al., 2010). Механизм действия IGF-1 до конца не ясен, однако, показано, что требуется тесный контакт между ФК и поверхностью ооцита для обеспечения оптимального ответа на инсулин. Полагают, что стероидные и пептидные пути действуют синергично, снижая уровень цАМФ, и запускают созревание.

На ФК обнаружены рецепторы к ацетилхолину, эндотелину, ангиотензину II и АТФ (Arellano et al., 1999; Kumar et al, 1993 King et al., 1996; Montiel-Herrera et al., 2011). Связывание с лигандами на поверхности ФК вызывает два типа ответов в ооците: входящие потоки Cl^- , не зависимые и зависимые от концентрации Ca в цитоплазме ооцита. Сигнальный каскад, приводящий к повышению концентрации Ca в ооците включает в себя: активацию фосфолипазы C в ФК, синтез диацилглицерола и инозитол-3-фосфата, который проникает в ооцит через ЩК. Последующее повышение концентрации Ca в ооците вызывает открытие Ca -зависимых Cl^- каналов (Arellano et al., 2012). На основании электро-физиологических данных авторы предполагают существование двух типов ФК, контакты которых проницаемы и не проницаемы для инозитол-3-фосфата. Эндотелин и ацетилхолин *in vitro* усиливают созревание ооцитов, индуцированное Пг (Dascal et al., 1984; Sandberg et al., 1990), по-видимому, через механизм активации фосфолипазы C.

На целый ряд воздействий (гонадотропины, аденозин и др.) фолликулы отвечают усилением исходящих токов K^+ через K_{ATP} -зависимые каналы, активация которых происходит с участием

цАМФ (Miledi, Woodward, 1989). K_{ATP} каналы находятся на мембранах ФК. Активация потоков K^+ повышает скорость и эффективность созревания ооцитов под действием Пг. В регуляции K^+ каналов участвуют паракринные механизмы системы фолликула с участием АТФ (Saldaña et al., 2005). Баланс ионных потоков на поверхности фолликула и ооцита определяет потенциал на мембране ооцита и является важной составляющей в процессе оогенеза и созревания. Входящие потоки ионов Cl^- и выходящие потоки K^+ на мембране ооцита и ФК соответственно вызывают гиперполяризацию их плазматических мембран и, способствуют возобновлению мейотического деления ооцита.

Авторы выражают благодарность д.б.н. А.В. Белявскому за помощь в работе над статьей, а также д.б.н. М.Н. Скоблиной и д.б.н. С.Г. Васецкому за полезные критические замечания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Скоблина М.Н. Созревание окруженных фолликулярными оболочками ооцитов травяной лягушки (*Rana temporaria*), стимулированное низкими концентрациями прогестерона, зависит от транскрипции // Онтогенез. 2003. Т. 34. № 2. С. 137–141.

Скоблина М.Н. Участие щелевых контактов в стимуляции созревания ооцитов травяной лягушки *in vitro* низкими концентрациями прогестерона // Онтогенез. 2004. Т. 35. № 5. С. 350–355.

Adashi E.Y., Resnick C.E., D’Ercole A.J. et al. Insulinlike growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function // Endocr. Rev. 1985. V. 6. P. 400–420.

Ahn R.S., Yoo M.S., Kwon H.B. Evidence for two-cell model of steroidogenesis in four species of amphibian // J. Exp. Zool. 1999. V. 284. P. 91–99.

Albanese-Carmignani M.P., Zaccone G.A. Comparative cytochemical study of the yolk platelets in the growing oocytes of *Triturus cristatus* and *Rana esculenta* // Acta Histochem. 1977. V. 59. P. 273–284.

Andersen C.B., Sakaue H., Nedachi T. et al. Protein kinase B/Akt is essential for the insulin- but not progesterone-stimulated resumption of meiosis in *Xenopus* oocytes // Biochem. J. 2003. V. 369. № 2. P. 227–238.

Arellano R.O., Garay E., Miledi R. Muscarinic receptor heterogeneity in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes // J. Physiol. 1999. V. 521. № 2. P. 409–419.

Arellano R.O., Robles-Martínez L., Serrano-Flores B. et al. Agonist-activated Ca^{2+} influx and Ca^{2+} -dependent Cl^- channels in *Xenopus* ovarian follicular cells: functional heterogeneity within the cell monolayer // J. Cell Physiol. 2012. V. 227. № 10. P. 3457–3470.

Ascoli M., Fanelli F., Segaloff D.L. The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective // Endocrin. Rev. 2002. V. 23. P. 141–174.

- Bayaa M., Booth R.A., Sheng Y. et al. The classical progesterone receptor mediates *Xenopus* oocyte maturation through a nongenomic mechanism // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. № 23. P. 12607–12612.
- Beyo R.S., Sreejith P., Divya L. et al. Ultrastructural observations of previtellogenic ovarian follicles of the caecilians *Ichthyophis tricolor* and *Gegeneophis ramaswamii* // J. Morphol. 2007. V. 268. № 4. P. 329–342.
- Browne C.L., Werner W. Intercellular junctions between the follicle cells and oocytes of *Xenopus laevis* // J. Exp. Zool. 1984. V. 230. P. 105–113.
- Bruzzzone A., Buschiazzo J., Alonso T.S. Lipids during *Bufo arenarum* oogenesis // Zygote. 2003. V. 11. P. 95–100.
- Buratini J., Price C.A. Follicular somatic cell factors and follicle development // Reprod. Fertil. Dev. 2011. V. 23(1). P. 32–39.
- Buschiazzo J., Alonso T.S. Effect of meiotic maturation on yolk platelet lipids from *Bufo arenarum* oocytes // J. Exp. Zool. 2005. V. 303. P. 813–822.
- Buschiazzo J., Bruzzzone A., Alonso T.S. Detailed lipid analysis of yolk platelets of amphibian (*Bufo arenarum*) oocytes // J. Exp. Zool. 2003. V. 297. P. 189–195.
- Cieniewicz A.M., Woodruff R.I. Passage through vertebrate gap junctions of 17/18 kDa molecules is primarily dependent upon molecular configuration // Tissue Cell 2010. V. 42. P. 47–52.
- Coggins L.W. An ultrastructural and radioautographic study of early oogenesis in the toad *Xenopus laevis* // J. Cell Sci. 1973. V. 12. P. 71–93.
- Conti M., Andersen C.B., Richard F. et al. Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation // Mol. Cell Endocrinol. 2002. V. 187. P. 153–159.
- Curran J.E., Woodruff R.I. Passage of 17 kDa calmodulin through gap junctions of three vertebrate species // Tissue Cell. 2007. V. 39. P. 303–309.
- Dascal N., Yekuel R., Oron Y. Acetylcholine promotes progesterone-induced maturation of *Xenopus* oocytes // J. Exp. Zool. 1984. V. 230. P. 131–135.
- De Boer T.P., Kok B., Roël G. et al. Cloning, embryonic expression, and functional characterization of two novel connexins from *Xenopus laevis* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2006. V. 349(2). P. 855–862.
- De Boer T.P., Kok K., Neuteboom K.I.E. et al. Cloning and functional characterization of a novel connexin expressed in somites of *Xenopus laevis* // Dev. Dyn. 2005a. V. 233. P. 864–971.
- De Boer T.P., van der Heyden M.A.G. *Xenopus* connexins: how frogs bridge the gap // Differentiation. 2005b. V. 73. P. 330–340.
- Dekel N., Beers W.H. Rat oocyte maturation *in vitro*: relief of cyclic AMP inhibition by gonadotropins // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1978. V. 75(9). P. 4369–4373.
- Dekel N., Galiani D., Sherizly I. Dissociation between the inhibitory and the stimulatory action of cAMP on maturation of rat oocytes // Mol. Cell Endocrinol. 1988. V. 56. P. 115–121.
- Deng J., Lang S., Wylie C. et al. The *Xenopus laevis* isoform of G protein-coupled receptor 3 (GPR3) is a constitutively active cell surface receptor that participates in maintaining meiotic arrest in *X. laevis* oocytes // Mol. Endocrinol. 2008. V. 22(8). P. 1853–1865.
- Dumont J.N. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals // J. Morphol. 1972. V. 136. P. 153–79.
- Dumont J.N., Brummett A.R. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). V. Relationships between developing oocytes and their investing follicular tissues // J. Morphol. 1978. V. 155. № 1. P. 73–97.
- El-Etr M., Schorderet-Slatkine S., Baulieu E.E. Meiotic maturation in *Xenopus laevis* oocytes initiated by insulin // Science. 1979. V. 205. P. 1397–399.
- El-Etr M., Schorderet-Slatkine S., Baulieu E.E. The role of zinc and follicle cells in insulin-initiated meiotic maturation of *Xenopus laevis* oocytes // Science. 1980. V. 210. P. 929–930.
- El-Zein G., Boujard D., Garnier D.H. et al. The dynamics of the steroidogenic response of perfused *Xenopus* ovarian explants to gonadotropins // Gen. Comp. Endocrinol. 1988. V. 71(1). P. 132–140.
- Evaul K., Jamnongjit M., Bhagavath B. et al. Testosterone and progesterone rapidly attenuate plasma membrane Gbetagamma-mediated signaling in *Xenopus laevis* oocytes by signaling through classical steroid receptors // Mol. Endocrinol. 2007. V. 21. № 1. P. 186–196.
- Falconi R., Petrini S., Quaglia A. et al. Fine structure of undifferentiated gonads in *Rana dalmatina* tadpoles // Ital. J. Zool. 2001. V. 68. P. 15–21.
- Finn R.N. Vertebrate yolk complexes and the functional implications of phosvitins and other subdomains in vitellogenins // Biol. Reprod. 2007. V. 76. P. 926–935.
- Fortune J.E. Steroid production by *Xenopus* ovarian follicles at different developmental stages // Dev. Biol. 1983. V. 99. P. 502–509.
- Fortune J.E., Ming Y.Y., Wanzirai M. *In vitro* and *in vivo* regulation of follicular formation and activation in cattle // Reprod. Fertil. Dev. 2011. V. 23. P. 15–22.
- Gallo C.J., Hand A.R., Jones T.L. et al. Stimulation of *Xenopus* oocyte maturation by inhibition of the G-protein alpha S subunit, a component of the plasma membrane and yolk platelet membranes // J. Cell Biol. 1995. V. 130. № 2. P. 275–284.
- Gerber-Huber S., Nardelli D., Haefliger J.A. et al. Precursor-product relationship between vitellogenin and the yolk proteins as derived from the complete sequence of a *Xenopus* vitellogenin gene // Nucleic Acids Res. 1987. V. 15. P. 4737–4760.
- Gimlich R.L., Kumar N.M., Gilula N.B. Differential regulation of the levels of three gap junction mRNAs in *Xenopus* embryos // J. Cell Biol. 1990. V. 110. P. 597–605.

- Gohin M., Bodinier P., Fostier A. et al. Aromatase expression in *Xenopus* oocytes: a three cell-type model for the ovarian estradiol synthesis // J. Mol. Endocrinol. 2011. V. 47. P. 241–250.
- Haccard O., Dupré A., Liere P. et al. Naturally occurring steroids in *Xenopus* oocyte during meiotic maturation. Unexpected presence and role of steroid sulfates // Mol. Cell Endocrinol. 2012. V. 362. P. 110–119.
- Hamazaki T.S., Iuchi I., Yamagami K. Purification and identification of vitellogenin and its immunohistochemical detection in growing oocytes of the teleost, *Oryzias latipes* // J. Exp. Zool. 1987. V. 242. P. 333–341.
- Harris A.L. Connexin channel permeability to cytoplasmic molecules // Prog. Biophys. Mol. Biol. 2007. V. 94. № 2. P. 120–143.
- Harris J.D., Hibler D.W., Fontenot G.K. et al. Cloning and characterization of zona-pellucida genes and cDNAs from a variety of mammalian – species-the ZPA, ZPB and ZPC gene families // DNA Seq. 1994. V. 4. № 6. P. 361–393.
- Hedrick J.L. Anuran and pig egg zona pellucida glycoproteins in fertilization and early development // Int. J. Dev. Biol. 2008. V. 52. P. 683–701.
- Hsü C.Y., Lü M.H., Huang H.T. et al. The correlation of fine structure with endocrine function of ovarian follicle cells in tadpoles // Gen. Comp. Endocrinol. 1985. V. 57. № 1. P. 77–87.
- Iwasawa H., Yamaguchi K. Ultrastructural study of gonadal development in *Xenopus laevis* // Zool. Sci. (Japan) 1984. V. 1. P. 591–600.
- Jagarlamudi K., Rajkovic A. Oogenesis: transcriptional regulators and mouse models // Mol. Cell Endocrinol. 2012. V. 356. № 1–2. P. 31–39.
- Josefsberg B.-Y.L., Lewellyn A.L., Thomas P. et al. The role of *Xenopus* membrane progesterone receptor beta in mediating the effect of progesterone on oocyte maturation // Mol. Endocrinol. 2007. V. 21. № 3. P. 664–673.
- Kessi E., Guixé V., Preller A. et al. Glycogen synthesis in amphibian oocytes: Evidence for an indirect pathway // J. Biochem. 1996. V. 315. P. 455–460.
- Kim J.Y. Control of ovarian primordial follicle activation // Clin. Ex. Reprod. Med. 2012. V. 39. № 1. P. 10–14.
- King B.F., Pintor J., Wang S. et al. A novel P1 purinoreceptor activates an outward K⁺ current in follicular oocytes of *Xenopus laevis* // The J. Pharmacol. Exp. Ther. 1996. V. 276. P. 93–100.
- Kloc M., Bilinski S., Dougherty M.T. et al. Formation, architecture and polarity of female germline cyst in *Xenopus* // Dev. Biol. 2004. V. 266. P. 43–61.
- Kubo H., Kawano T., Tsubuki S. et al. Egg envelope glycoprotein gp37 as a *Xenopus* homolog of mammalian ZP1, based on cDNA cloning // Dev. Growth Diff. 2000. V. 42. P. 419–427.
- Kumar C.S., Nuthulaganti P., Pullen M. et al. Novel endothelin receptors in the follicular membranes of *Xenopus laevis* oocytes mediate calcium responses by signal transduction through gap junctions // Mol. Pharmacol. 1993. V. 44. № 1. P. 153–157.
- Kwon H.B., Ahn R.S. Relative roles of theca and granulosa cells in ovarian follicular steroidogenesis in the amphibian, *Rana nigromaculata* // Gen. Comp. Endocrinol. 1994. V. 94. № 2. P. 207–214.
- Kwon H.B., Lim Y.K., Choi M.J. et al. Spontaneous maturation of follicular oocytes in *Rana dybowskii* in vitro: seasonal influences, progesterone production and involvement of camp // J. Exp. Zool. 1989. V. 252. P. 190–199.
- Laird D.W. Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction internalization and degradation // Biochim. Biophys. Acta. 2005. V. 1711. P. 172–182.
- Landesman Y., Postma F.R., Goodenough D.A. et al. Multiple connexins contribute to intercellular communication in the *Xenopus* embryo // J. Cell Sci. 2003. V. 116. P. 29–38.
- Lin Y.W., Kwon H.B., Petrino T.R. et al. Studies on the mechanism of action of estradiol in regulating follicular progesterone levels: effects on cAMP mediated events and 3-hydroxysteroid dehydrogenase // Dev. Growth Diff. 1988. V. 30. P. 611–618.
- Liu X.S., Ma C., Hamam Al-W. et al. Transcription-dependent and transcription-independent functions of the classical progesterone receptor in *Xenopus* ovaries // Dev. Biol. 2005. V. 283. P. 180–190.
- Luque M.E., Serrano M.D., Mónaco M.E. et al. Involvement of cAMP and calmodulin in endocytic yolk uptake during *Xenopus laevis* oogenesis // Zygote. 2011. V. 4. P. 1–9.
- Lutz L.B., Cole L.M., Gupta M.K. et al. Evidence that androgens are the primary steroids produced by *Xenopus laevis* ovaries and may signal through the classical androgen receptor to promote oocyte maturation // Proc. Natl. Acad. Sci. 2001. V. 98. № 24. P. 13728–13733.
- Lutz L.B., Jamnongjit M., Yang W.H. et al. Selective modulation of genomic and nongenomic androgen responses by androgen receptor ligands // Mol. Endocrinol. 2003. V. 17. № 6. P. 1106–1116.
- Maller J.L., Koontz J.W. A study of the induction of cell division in amphibian oocytes by insulin // Dev. Biol. 1981. V. 85. P. 309–316.
- Martinez S., Grandy R., Pasten P. et al. Plasma membrane destination of the classical *Xenopus laevis* progesterone receptor accelerates progesterone-induced oocyte maturation // J. Cell Biochem. 2006. V. 99. № 3. P. 853–859.
- Martinez S., Pastén P., Suarez K. et al. Classical *Xenopus laevis* progesterone receptor associates to the plasma membrane through its ligand-binding domain // J. Cell Physiol. 2007. V. 211. № 2. P. 560–567.
- Matsuda F., Inoue N., Manabe N. et al. Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells // J. Reprod. Dev. 2012. V. 58. № 1. P. 44–50.

- Mehlmann L.M. Oocyte-specific expression of Gpr3 is required for the maintenance of meiotic arrest in mouse oocyte // *Dev. Biol.* 2005. V. 288. № 2. P. 397–404.
- Mehlmann L.M., Saeki Y., Tanaka S. et al. The Gs-linked receptor GPR3 maintains meiotic arrest in mammalian oocytes // *Science*. 2004. V. 306. № 5703. P. 1947–1950.
- Miledi R., Woodward R.M. Effects of defolliculation on membrane current responses of *Xenopus* oocytes // *J. Physiol. Lond.* 1989. V. 416. P. 601–621.
- Miwa S., Ya L., Swanson P. Localization of two gonadotropin receptors in the salmon gonad by *in vitro* ligand autoradiography // *Biol. Reprod.* 1994. V. 50. P. 629–642.
- Monaco M.E., Vилlecco E.I., Sánchez S.S. Implication of gap junction coupling in amphibian vitellogenin uptake // *Zygote*. 2007. V. 15. № 2. P. 149–157.
- Montiel-Herrera M., Zaske A.M., Garcia-Colunga J. et al. Ion currents induced by ATP and angiotensin II in cultured follicular cells of *Xenopus laevis* // *Mol. Cells*. 2011. V. 32. P. 397–404.
- Mulner O., Ozon R. The roles of follicular envelopes in the initiation of *Xenopus* oocyte maturation // *Gen. Comp. Endocrinol.* 1981. V. 44. № 3. P. 335–43.
- Mulner O., Thibier C., Ozon R. Steroid biosynthesis by ovarian follicles of *Xenopus laevis* *in vitro* during Oogenesis // *Gen. Comp. Endocrinol.* 1978. V. 34. P. 287–295.
- Neijssen J., Herberts C., Drijfhout J.W. et al. Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions // *Nature*. 2005. V. 434. P. 83–88.
- Oba Y., Hirai T., Yohiura Y. et al. Cloning and functional characterization of a gonadotropin receptor cDNA expressed in the ovary and testis of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1999a. V. 263. P. 584–590.
- Oba Y., Hirai T., Yohiura Y. et al. The duality of fish gonadotropin receptors: cloning and characterization of a second gonadotropin receptor cDNA expressed in the ovary and testis of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1999b. V. 265. P. 366–371.
- O'Brien E.D., Salicioni A.M., Cabada M.O. et al. Vitellogenesis in *Bufo arenarum*: identification, characterization and immunolocalization of high molecular mass lipovitellin during oogenesis // *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 2010. V. 155. № 3. P. 256–265.
- Ogielska M., Kotusz A. Pattern and rate of ovary differentiation with reference to somatic development in Anuran amphibians // *J. Morphol.* 2004. V. 259. P. 41–54.
- Opresko L.K., Wiley H.S. Receptor-mediated endocytosis in *Xenopus* oocytes I. Characterization of the vitellogenin receptor system // *J. Biol. Chem.* 1987. V. 262. P. 4109–4115.
- Opresko L., Wiley H.S., Wallace R.A. Differential postendocytotic compartmentation in *Xenopus* oocytes is mediated by a specifically bound ligand // *Cell*. 1980. V. 22. P. 47–57.
- Panchin Y. Evolution of gap junction proteins – the pannexin alternative // *J. Exp. Biol.* 2005. V. 208. P. 1415–1419.
- Patiño R., Purkiss R.T. Inhibitory effects of n-alkanols on the hormonal induction of maturation in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes: implications for gap junctional transport of maturation-inducing steroid // *Gen. Comp. Endocrinol.* 1993. V. 91. № 2. P. 189–198.
- Pepling M.E., Spradling A.C. Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles // *Dev. Biol.* 2001. V. 234. P. 339–351.
- Polzonetti-Magni A.M., Mosconi G., Carnevali O. et al. Gonadotropins and reproductive function in the anuran amphibian, *Rana esculenta* // *Biol. Reprod.* 1998. V. 58. № 1. P. 88–93.
- Preller A., Kessi E., Ureta T. Glycogen synthesis by the direct or indirect pathways depends on glucose availability: *in vivo* studies in frog oocytes // *FEBS Lett.* 2007. V. 581. P. 663–666.
- Redshaw M.R. The hormonal control of the amphibian ovary // *Amer. Zoologist*. 1972. V. 12. P. 289–306.
- Ríos-Cardona D., Ricardo-González R.R., Chawla A. et al. A role for GPRx, a novel GPR3/6/12-related G-protein coupled receptor, in the maintenance of meiotic arrest in *Xenopus laevis* oocytes // *Dev. Biol.* 2008. V. 317. № 1. P. 380–388.
- Sadler S.E., Angleson J.K., Dsouza M. IGF-1 Receptors in *Xenopus laevis* ovarian follicle cells support the oocyte maturation response // *Biol. Reprod.* 2010. V. 82. P. 591–598.
- Saldaña C., Vázquez-Cuevas F., Garay E. et al. Epithelium and/or theca are required for ATP-elicited K⁺ current in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes // *J. Cell Physiol.* 2005. V. 202. № 3. P. 814–821.
- Sandberg K., Bor M., Markwick A. et al. Angiotensin II-induced calcium mobilization in oocytes by signal transfer through gap junctions // *Science*. 1990. V. 249. P. 298–301.
- Sheng Y., Montplaisir V., Liu X.J. Co-operation of G α and G $\beta\gamma$ in maintaining G2 arrest in *Xenopus* oocytes // *J. Cell Physiol.* 2005. V. 202. № 1. P. 32–40.
- Sheng Y., Tiberi M., Booth R.A. et al. Regulation of *Xenopus* oocyte meiosis arrest by G protein betagamma subunits // *Curr. Biol.* 2001. V. 11. № 6. P. 405–416.
- Smits G., Campillo M., Govaerts C. et al. Glycoprotein hormone receptors: Determinants in leucine-rich repeats responsible for ligand specificity // *EMBO J.* 2003. V. 22. P. 2692–2703.
- Sosinsky G.E., Boassa D., Dermietzel R. et al. Pannexin channels are not gap junction hemichannels // *Channels (Austin)*. 2011. V. 5. № 3. P. 193–197.
- Sretarugsa P., Wallace R.A. The developing *Xenopus* oocyte specifies the type of gonadotropin-stimulated steroidogenesis performed by its associated follicle cells // *Dev. Growth. Differ.* 1997. V. 39. № 1. P. 87–97.

- Stifani S., Nimpf J., Schneider W.J.* Vitellogenesis in *Xenopus laevis* and chicken: cognate ligands and oocyte receptors // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265. № 2. P. 882–888.
- Swenson K.I., Jordan J.R., Beyer E.C. et al.* Formation of gap junctions by expression of connexins in *Xenopus* oocyte pairs // *Cell*. 1989. V. 57. P. 145–155.
- Tanimura A., Iwasawa H.* Ultrastructural observations on the origin and differentiation of somatic cells during gonadal development in the frog *Rana nigromaculata* // *Dev. Growth. Differ.* 1988. V. 30. P. 681–691.
- Thibier-Fouchet C., Mulner O., Ozon R.* Progesterone biosynthesis and metabolism by ovarian follicles and isolated oocytes *Xenopus laevis* // *Biol. Reprod.* 1976. V. 14. P. 317–326.
- Tian J., Kim S., Heilig E. et al.* Identification of XPR-1, a progesterone receptor required for *Xenopus* oocyte activation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. № 26. P. 14358–14363.
- Uribe M.C.A.* The ovary and oogenesis // *Sever D.M. Reproductive Biology and Phylogeny of Urodela.* V. 1. Science Publishers. 2003. P. 135–150.
- Valiunas V., Polosina Y.Y., Miller H. et al.* Connexin-specific cell-to-cell transfer of short interfering RNA by gap junctions // *J. Physiol.* 2005. V. 568. № 2. P. 459–468.
- Varriale B., Pierantoni R., Di Matteo et al.* Relationship between estradiol-17 beta seasonal profile and annual vitellogenin content of liver, fat body, plasma, and ovary in the frog (*Rana esculenta*) // *Gen. Comp. Endocrinol.* 1988. V. 69. P. 328–34.
- Veenstra R.D., Wang H.Z., Beblo D.A. et al.* Selectivity of connexin-specific gap junctions does not correlate with channel conductance // *Circ. Res.* 1995. V. 77. P. 1156–1165.
- Veitch G.I., Gittens J.E., Shao Q. et al.* Selective assembly of connexin37 into heterocellular gap junctions at the oocyte/granulosa cell // *J. Cell Sci.* 2004. V. 117. P. 2699–2707.
- Vilain J.P., Moreau M., Guerrier P.* Uncoupling of oocytes follicle cells triggers reinitiation of meiosis in amphibian oocytes // *Dev. Growth Differ.* 1980. V. 22. P. 687–691.
- Villecco E.I., Aybar M.J., Genta S.B. et al.* Effect of gap junction uncoupling in full-grown *Bufo arenarum* ovarian follicles: participation of cAMP in meiotic arrest // *Zygote.* 2000. V. 8. P. 171–179.
- Villecco E.I., Mónaco M.E., Sánchez S.S.* Ultrastructural changes in the follicular epithelium of *Ceratophrys cranwelli* previtellogenic oocytes // *Zygote.* 2007. V. 15. № 3. P. 273–83.
- Wahli W., Germond J.E., ten Heggeler B. et al.* Vitellogenin genes A1 and B1 are linked in the *Xenopus laevis* genome // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1982. V. 79. № 22. P. 6832–6836.
- Wallace R.A., Hoch K.L., Carnevali O.* Placement of small lipovitellin subunits within the vitellogenin precursor in *Xenopus laevis* // *J. Mol. Biol.* 1990. V. 213. P. 407–409.
- Wallace R.A., Jared D.W., Dumont J.N. et al.* Protein incorporation by isolated amphibian oocytes. 3. Optimum incubation conditions // *J. Exp. Zool.* 1973. V. 184. P. 321–333.
- Wallace R.A., Selman K.* Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians // *J. Electron. Microsc. Tech.* 1990. V. 16. № 3. P. 175–201.
- Wallace R., Dumont J.N.* The induced synthesis and transport of yolk proteins and their accumulation by the oocyte in *Xenopus laevis* // *J. Cell Physiol.* 1968. V. 72. P. 73–89.
- White S.N., Jamnongjit M., Gill A. et al.* Specific modulation of nongenomic androgen signaling in the ovary // *Steroids.* 2005. V. 70. № 5–7. P. 352–360.
- Wiley H.S., Wallace R.A.* The structure of vitellogenin. Multiple vitellogenins in *Xenopus laevis* give rise to multiple forms of the yolk proteins // *J. Biochem.* 1981. V. 256. P. 8626–8634.
- Wright C.S., Becker D.L., Lin J.S. et al.* Stage-specific and differential expression of gap junctions in the mouse ovary: connexin-specific roles in follicular regulation // *Reproduction.* 2001. V. 121. № 1. P. 77–88.
- Yamaguchi S., Hedrick J.L., Katagiri C.* The synthesis and localization of envelope glycoproteins in oocytes of *Xenopus laevis* using immunocytochemical methods // *Dev. Growth Differ.* 1989. V. 31. P. 85–94.
- Yang J.C., Hedrick J.L.* cDNA cloning and sequence analysis of the *Xenopus laevis* egg envelope glycoprotein gp43 // *Dev. Growth Differ.* 1997. V. 39. P. 457–467.
- Yang W.H., Lutz L.B., Hammes S.R.* *Xenopus laevis* ovarian CYP17 is a highly potent enzyme expressed exclusively in oocytes. Evidence that oocytes play a critical role in *Xenopus* ovarian androgen production // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 9552–9559.
- Yoshitome S., Nakamura H., Nakajo N. et al.* Mr 25 000 protein, a substrate for protein serine/threonine kinases, is identified as a part of *Xenopus laevis* vitellogenin B1 // *Dev. Growth Differ.* 2003. V. 45. P. 283–294.
- Yoshizaki G., Patiño R.* Molecular cloning, tissue distribution, hormonal control in the ovary of Cx41 mRNA, a novel *Xenopus* connexin gene transcript // *Mol. Reprod. Dev.* 1995. V. 42. P. 7–18.
- Zelarayán L.I., Ajmat M.T., Bonilla F. et al.* Involvement of G protein and purines in *Rhinella arenarum* oocyte maturation // *Zygote.* 2012. V. 2. P. 1–10.
- Zelarayán L., Oterino J., Bühler M.I.* Spontaneous maturation in *Bufo arenarum* oocytes: follicle wall involvement, respiratory activity and seasonal influences // *J. Exp. Zool.* 1995. V. 272. P. 356–62.
- Zhu Y., Bond J., Thomas P.* Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progesterin receptor // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. № 5. P. 2237–2242.

Follicular Cells of the Amphibian Ovary: Origin, Structure, and Functions

V. V. Konduktorova^{a, b} and N. N. Luchinskaya^a

^a Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

^b Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia
e-mail: venir5@mail.ru

Received October 16, 2012; in final form, December 7, 2012

Abstract—Formation of the follicular envelopes surrounding oocytes in the developing ovary and their subsequent morphological differentiation go hand-in-hand with succession of the steroidogenesis stages, arrest of meiosis and its maintenance, establishment of the conditions necessary for vitellogenesis, oocyte growth, and maturation. Metabolites are exchanged via gap junctions and receptor-mediated transport through the perioocytic space. The ion transport in follicular cells (FCs) regulates the plasma membrane potential, creating the conditions for efficient directed transport through gap junctions. Manifold biologically active substances accepted by follicular cells are an additional adjusting lever for regulating the state of follicle system. In this review, we have attempted to emphasize the amphibian FCs as key players in the follicle system; the more so as we have failed to find any review that would bring together the data on the origin of amphibian FCs, their morphology, as well as regulation of oocyte growth and development. As a rule, recent works in this field focus on the molecular mechanisms providing for regulation of individual stages in oocyte development. This review describes the origin and changes in the morphology of follicular cells during the development of *Xenopus laevis* oocyte as well as the data on their regulatory functions in vitellogenesis and their involvement in steroidogenesis, maintenance of meiotic arrest, and subsequent maturation.

Keywords: amphibian, follicular cells, oogenesis, gap junctions, vitellogenesis, steroidogenesis