

Флуктуация содержания кальция во внутриклеточных депо нативных и девитрифицированных ооцитов свиней

В.Ю. ДЕНИСЕНКО, Т.И. КУЗЬМИНА

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных РАСХН, Санкт-Петербург, Пушкин

Calcium Fluctuation in Intracellular Depots of Intact and Devitrified Pig Oocytes

V.YU. DENISENKO, T.I. KUZMINA

All-Russian Scientific Research Institute of Genetics and Farm Animal Breeding of the Russian Academy of Agricultural Sciences, St.-Petersburg, Pushkin, Russia

Создание криобанка донорских ооцитов млекопитающих позволит интенсифицировать внедрение клеточных репродуктивных технологий в биомедицину и животноводство. Флуктуация содержания кальция – индикатор функционального состояния ооцитов животных при созревании *in vitro* [Kuzmina *et al.*, 2007]. Цель настоящей работы – на основе ингибиторного анализа исследовать освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо (ВД) нативных и девитрифицированных ооцитов при воздействии соматотропина (СТГ) и ГТФ. Ооциты, выделенные из яичников на стадии фолликулярного роста, витрифицировали в соответствии с методикой, описанной ранее [Денисенко, Кузьмина, 2012]. Концентрацию кальция во ВД измеряли с помощью хлортетрациклина (ХТЦ). Ооциты инкубировали 5 мин при 37°C в среде Дюльбекко, содержащей 40 мкМ ХТЦ. Флуоресценцию комплекса Ca^{2+} -ХТЦ-мембрана возбуждали ртутной лампой ДРШ-250 М. Для выделения возбуждающей флуоресценцию длины волны с максимумом на 390 нм применяли светофильтры СС и СЗС, флуоресценцию регистрировали на длине волны 520 нм. Исходную популяцию ооцитов оценивали с помощью витального красителя бриллиантового кристаллического голубого (BCB, «Sigma») и в соответствии с окраской делили на две группы: завершившие фазу роста (окрашенная ооплазма) и растущие ооциты (отсутствие окраски). В работе использовали завершившие фазу роста ооциты, их витрифицировали и после окрашивания вновь инкубировали с BCB. Ооплазма девитрифицированных завершивших стадию роста ооцитов после экспозиции с BCB оставалась окрашенной. В нативных ооцитах при совместном действии СТГ в концентрации 10 нг/мл и ГТФ в концентрации 10 мкМ фиксировали переход Ca^{2+} между различными ВД, о чем свидетельствовало дополнительное освобождение Ca^{2+} из ВД при совместном действии СТГ и ГТФ. Освобождение Ca^{2+} из ВД вызывает рост концентрации Ca^{2+} в цитоплазме и обеспечивает прохождение мейоза [Santella *et al.*, 1999]. Добавление ингибитора полимеризации микротрубочек нокодазола (10 мкМ) отменяло дополнительное освобождение Ca^{2+} из ВД и соответственно перемещение Ca^{2+} между ВД, стимулированное совместным действием СТГ и ГТФ. В ооцитах после девитрификации при совместном действии СТГ и ГТФ также наблюдали дополнительное освобождение Ca^{2+} из ВД ооцитов, эффект ингибировался нокодазолом. Таким образом, в ооцитах витрификация не оказывает влияния на перемещение Ca^{2+} между различными ВД, стимулированное совместным действием СТГ и ГТФ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект офи-а 10-04-00389).

Establishing a cryobank for mammalian donor's oocytes will allow to intensify the introduction of cell reproductive technologies in biomedicine and animal breeding. Calcium fluctuation is an indicator of functional state of animal oocytes during maturation *in vitro* [Kuzmina *et al.*, 2007]. The research aim was to study Ca^{2+} release out of intracellular depots (IDs) of native and devitrified oocytes under effect of somatotropin (STH) and GTF based on inhibitory analysis. Oocytes isolated from ovaries at follicular growth stage were vitrified according to the previously described method [Denisenko and Kuzmina, 2012]. Calcium concentration in IDs was measured with chlortetracycline (ChTC). Oocytes were incubated for 5 min at 37°C in Dulbecco's medium containing 40 μM of ChTC. Fluorescence of Ca^{2+} -ChTC-membrane complex was excited with DRSh-250 M mercury lamp. There were used light filters SS and ESS to detect exciting fluorescence wavelength maximum at 390 nm. Fluorescence was recorded at wavelength of 520 nm. Initial population of oocytes was assessed with vital dye brilliant crystal blue (BCB, Sigma), and according with the staining it was divided into two groups: completed growth phase (stained ooplasm) and growing oocytes (without staining). Completed growth phase oocytes were used in the research, vitrified and incubated again with BCB after their staining. Ooplasm of devitrified completed growth stage oocytes after exposure with BCB remained stained. In native oocytes at a combined action of 10 ng/ml STH and 10 mM GTF Ca^{2+} transition among different IDs was revealed, as evidenced by additional Ca^{2+} release out of IDs at combined action of STH and GTF. Release of Ca^{2+} out of IDs causes a rise of Ca^{2+} concentrations in cytoplasm and provides meiosis [Santella *et al.*, 1999]. Addition of polymerization inhibitor of nocodazole microtubules (10 mM) avoided additional release of Ca^{2+} out of IDs and, accordingly, Ca^{2+} transition in IDs, stimulated by combined action of STH and GTF. There was also observed an additional Ca^{2+} release out of IDs in oocytes after devitrification at combined effect of STH and GTF. Effect was inhibited by nocodazole. Thus, vitrification in oocytes does not affect the Ca^{2+} transfer between different IDs, stimulated by combined action of STH and GTF.

This research was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project ofi-a 10-04-00389).