

УДК 636.2:612.621

В.Ю. Денисенко, Т.И. Кузьмина\*

## Мобилизация $\text{Ca}^{2+}$ из внутриклеточных депо ооцитов *Sus scrofa domestica* после витрификации и отогрева

UDC 636.2:612.621

V.Yu. Denisenko, T.I. Kuzmina\*

### Mobilization of $\text{Ca}^{2+}$ from Intracellular Stores in *Sus scrofa domestica* Oocytes After Vitrification and Thawing

**Реферат:** Несмотря на существенный прогресс в криоконсервировании эмбрионов и мужских гамет, витрификация ооцитов животных все еще представляет сложную и не до конца решенную проблему в силу высокой чувствительности клеточных компартментов женских гамет к воздействию сверхнизких температур и осмотическому стрессу. Данное исследование направлено на идентификацию внутриклеточных механизмов, детерминирующих криорезистентность ооцитов животных. С помощью флуоресцентного зонда хлортетрациклин были изучены особенности мобилизации  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо витрифицированных-отогретых ооцитов свиней. Установлено, что в таких клетках связь между различными внутриклеточными депо  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{IP}_3$ - и риадинчувствительными), в обеспечении которой участвуют микрофиламенты, разрушается, а связь между различными внутриклеточными депо  $\text{Ca}^{2+}$ , образуемая микротрубочками, претерпевает некоторые изменения. Гуанозинтрифосфат в витрифицированных-отогретых ооцитах утрачивает способность к образованию связи между различными внутриклеточными депо, тогда как наночастицы высокодисперсного кремнезема эту связь сохраняют. Выявлено, что в ооцитах, подвергнутых витрификации и отогреву, связь между различными внутриклеточными депо  $\text{Ca}^{2+}$  обеспечивают не только микротрубочки, но и протеинкиназа С.

**Ключевые слова:** кальций, витрификация, ооциты, *Sus scrofa domestica*.

**Реферат:** Незважаючи на істотний прогрес у криоконсервуванні ембріонів і чоловічих гамет, вітрифікація ооцитів тварин все ще представляє складну і не до кінця вирішену проблему через високу чутливість клітинних компартментів жіночих гамет до впливу наднизьких температур та осмотичного стресу. Дане дослідження спрямоване на ідентифікацію внутрішньоклітинних механізмів, які детермінують криорезистентність ооцитів тварин. За допомогою флуоресцентного зонда хлортетрациклін були вивчені особливості мобілізації  $\text{Ca}^{2+}$  із внутрішньоклітинних депо вітрифікованих-відігрітих ооцитів свиней. Встановлено, що в таких клітинах зв'язок між різними внутрішньоклітинними депо  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{IP}_3$ - і ріанодинчутливими), в забезпеченні якого беруть участь мікрофіламенти, руйнується, а зв'язок між різними внутрішньоклітинними депо  $\text{Ca}^{2+}$ , який утворюється микротрубочками, зазнає деяких змін. Гуанозинтрифосфат у вітрифікованих-відігрітих ооцитах втрачає здатність до утворення зв'язку між різними внутрішньоклітинними депо, тоді як наночастки високодисперсного кремнезему цей зв'язок зберігають. Виявлено, що в ооцитах, підданих вітрифікації і відігріванню, зв'язок між різними внутрішньоклітинними депо  $\text{Ca}^{2+}$  забезпечують не тільки микротрубочки, а й протеїнкіназа С.

**Ключові слова:** кальцій, вітрифікація, ооцити, *Sus scrofa domestica*.

**Abstract:** Despite a significant progress in cryopreservation of embryos and male gametes, the vitrification of animal oocytes has been still a complicated and not fully resolved task due to a high sensitivity of female gamete cell compartments to the effects of ultralow temperatures and osmotic stress. This study was aimed to identify the intracellular mechanisms, determining the cryoresistance of animal oocytes. The features of  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization from intracellular stores in vitrified porcine oocytes were studied using the fluorescent probe chlortetracycline. In these cells the relationship between different intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores ( $\text{IP}_3$  and ryanodine sensitive), provided by microfilament participation, was established to be destroyed, and that between various intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores, formed by microtubules, underwent certain changes. The guanosine triphosphate in vitrified and thawed oocytes became incapable of forming the bond between different intracellular stores, whereas the nanoparticles of highly dispersed silica preserved it. The bond between different intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores in the oocytes, subjected to vitrification and thawing, was established to be provided not only by microtubules, but protein kinase C as well.

**Key words:** calcium, vitrification, oocytes, *Sus scrofa domestica*.

Криоконсервированные эмбрионы успешно используются в медицине (вспомогательные репродуктивные технологии) и животноводстве (трансплантация эмбрионов) [9]. В этой связи важной задачей криобиологии является поиск условий криоконсервирования, обеспечивающих максимальную

Cryopreserved embryos are successfully used in medicine (assisted reproductive technologies) and animal breeding (embryo transplantation) [4]. In this regard, an important task in cryobiology is to find the cryopreservation conditions, ensuring the maximal viability of cells, oocytes in particular, after

Всероссийский научно-дослідний інститут генетики та розведення сільськогосподарських тварин, м. Санкт-Петербург, Росія

Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding, St.-Petersburg, Russia

\*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Московське шосе 55-а, м. Санкт-Петербург, Росія 196607;  
тел.: (+7812) 470-76-63, факс: (+7812) 465-99-89  
електронна пошта: prof.kouzmina@mail.ru

\*To whom correspondence should be addressed:

55a, str. Moscow Highway, St. Petersburg, Russia 196607;  
tel.: +7812 470 7663, fax: +7812 465 9989  
e-mail: prof.kouzmina@mail.ru

Надійшла 22.03.2017

Прийнята до друку 23.05.2018

Received March, 22, 2017

Accepted May, 23, 2018

© 2018 T.I. Kuzmina et al. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

жизнеспособность клеток, в частности ооцитов, после размораживания. T. Somfai и соавт. [33] было показано, что показатель жизнеспособности зрелых (стадия МII) деконсервированных ооцитов более высокий, чем незрелых ооцитов (стадия GV). При созревании выжившие ооциты, криоконсервированные на стадии GV, способны достигать стадии МII, как и некриоконсервированные (контрольные). При этом структура цитоскелета зрелых ооцитов после витрификации-отогрева аналогична структуре контрольных клеток [13]. В то же время в деконсервированных зрелых ооцитах млекопитающих наблюдается деструкция актиновых микрофиламентов, вследствие которой возможно формирование эмбрионов с аномальным числом хромосом [11]. Причинами указанных нарушений могут быть чувствительность мейотического веретена к охлаждению и токсические эффекты криопротекторов [21, 31]. Важным условием повышения выживаемости ооцитов после криоконсервирования является сохранение механизмов внутриклеточной  $Ca^{2+}$ -сигнализации. Показано, что низкая фертильность и нарушения в развитии витрифицированных ооцитов свиней на стадии МII могут быть обусловлены снижением экспрессии и аномальной локализацией  $IP_3$ -рецепторов первого типа, а обработка иономицином, который высвобождает  $Ca^{2+}$ , из эндоплазматического ретикулума (ЭПР), независимо от локализации  $IP_3$ -рецепторов первого типа, приводит к активации ооцитов после отогрева [18]. Несмотря на определенный прогресс в изучении влияния криоконсервирования на внутриклеточные процессы  $Ca^{2+}$ -сигнализации, недостаточно исследованными остаются механизмы мобилизации  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо, в частности транспорт  $Ca^{2+}$  между различными внутриклеточными депо.

Эндоплазматический ретикулум многих типов клеток является одним из основных внутриклеточных депо  $Ca^{2+}$ . Активация рианодиновых рецепторов или  $IP_3$ -рецепторов, расположенных в ЭПР, приводит к высвобождению  $Ca^{2+}$  в цитозоль клеток [8]. В ооцитах свиней его выход происходит по двум механизмам:  $IP_3$ -чувствительному и рианодинчувствительному [23]. Кроме ЭПР,  $Ca^{2+}$  хранится практически во всех внутриклеточных органеллах (митохондрии, оболочка ядра, комплекс Гольджи, лизосомы), которые контролируют его движение через свои мембраны, регулируя таким образом клеточные функции [24]. Цитоскелет также участвует в образовании связи между различными внутриклеточными депо  $Ca^{2+}$ . Между микротрубочками и ЭПР существует тесная взаимосвязь:

freeze-thawing. T. Somfai *et al.* demonstrated [33] the viability index in mature (stage MII) frozen-thawed oocytes to be higher than in immature ones (stage GV). When maturing, the survived oocytes, cryopreserved at the GV stage were able to reach the stage MII, as non-cryopreserved (control) ones. Moreover, the cytoskeletal structure of mature oocytes after vitrification-thawing was similar to that of control cells [13]. Herewith the destruction of actin microfilaments was observed in frozen-thawed mature mammalian oocytes, resulting in a possible formation of embryos with abnormal number of chromosomes [6]. The mentioned disorders may result from the sensitivity of meiotic spindle to cooling and toxic effects of cryoprotectants [21, 31]. An important condition for increasing the oocyte survival after cryopreservation is to preserve the intracellular  $Ca^{2+}$  signalling mechanisms. Low fertility and disordered development of vitrified porcine MII oocytes were demonstrated as resulted from a decrease in expression and abnormal localization of Type 1  $IP_3$  receptors, but the ionomycin treatment, which released  $Ca^{2+}$  from endoplasmic reticulum (EPR), regardless of the type 1  $IP_3$  receptor localization, led to oocyte activation after thawing [18]. Despite some progress in studying the cryopreservation effect on intracellular processes of  $Ca^{2+}$  signalling, the mechanisms of  $Ca^{2+}$  mobilization from intracellular stores, in particular  $Ca^{2+}$  transport between different intracellular stores, have still remained poorly studied.

Endoplasmic reticulum of many cell types is one of the main intracellular  $Ca^{2+}$  stores. The activation of either ryanodine receptors or  $IP_3$  ones, located in EPR leads to  $Ca^{2+}$  release into cell cytosol [2]. In porcine oocytes its release occurs by two mechanisms:  $IP_3$ -sensitive and ryanodine-sensitive ones [23]. In addition to EPR,  $Ca^{2+}$  is stored in virtually all the intracellular organelles (mitochondria, nuclear membrane, Golgi complex, lysosomes), controlling its movement through their membranes, thereby regulating the cell functions [24]. The cytoskeleton is also involved into formation of a bond between different intracellular  $Ca^{2+}$  stores. There is a close relationship between microtubules and EPR, *i. e.* the microtubules are always present at EPR sites [34]. In addition, the microtubules coordinate the interaction between nuclear membrane and EPR [32]. The permeabilized rat hepatocytes demonstrated an additional  $Ca^{2+}$  release from intracellular stores, stimulated by mutual action of  $IP_3$  receptors and guanosine triphosphate (GTP), to be inhibited in the presence of cytochalasin B, which destroyed microfilaments [17].

Previously, in porcine oocytes we demonstrated the cytoskeletal elements, *i. e.* microfilaments and microtubules to be involved into  $Ca^{2+}$  distribution



микротрубочки всегда присутствуют в местах расположения ЭПР [34]. Кроме того, микротрубочки координируют взаимодействие между оболочкой ядра и ЭПР [32]. На пермеабилizованных гепатоцитах крысы было показано, что стимулированное совместным действием  $IP_3$ -рецепторов и гуанозинтрифосфата дополнительное высвобождение  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо ингибировалось в присутствии цитохалазина В, разрушающего микрофиламенты [17].

Ранее на ооцитах свиней было показано, что в распределении  $Ca^{2+}$  между различными внутриклеточными депо ( $IP_3$ - и рианодинчувствительными рецепторами) вовлечены элементы цитоскелета – микрофиламенты и микротрубочки. Исследование в клетках процессов, в которых участвуют микротрубочки, затруднено из-за присутствия интактных микрофиламентов, поэтому при выполнении работы были использованы дополнительные процедуры ингибирования полимеризации микрофиламентов [4]. Следует отметить, что разрушение микрофиламентов в девитрифицированных ооцитах свиней может происходить вследствие воздействия холода [29], что дает возможность изучать процессы, в которых участвуют микротрубочки, без предварительного использования ингибитора цитохалазина Д.

Ранее было показано, что высокодисперсный кремнезем участвует в образовании связи между различными внутриклеточными депо кальция в сперматозоидах быков [1]. Действие пролактина, теофиллина и гуаниновых нуклеотидов (гуанозинтрифосфата и гуанозиндифосфата) стимулировало освобождение  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо ооцитов коров [2, 3].

В связи с вышеизложенным целью настоящей работы было исследование высвобождения  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо витрифицированных ооцитов свиней при сочетанном воздействии пролактина и гуанозинтрифосфата, а также теофиллина и гуанозиндифосфата в присутствии высокодисперсного кремнезема.

### Материалы и методы

В работе использовали яичники свиней (*Sus scrofa domestica*) породы Ландрас. Яичники находились на стадии фолликулярного роста и не имели видимой патологии. Ооцит-кумуляные комплексы выделяли из антральных фолликулов (диаметр 3–6 мм) с широко разветвленной сетью капилляров, высоким тургором и прозрачной оболочкой. Для экспериментов отбирали ооциты округлой формы, окруженные пятью и более слоями клеток кумулюса с тонкогранулированной ооплазмой и зоной пеллюцида, равномерной по ширине.

between different intracellular stores ( $IP_3$ - and ryanodine sensitive receptors). The study of cell processes, where the microtubules are involved, is complicated due to the presence of intact microfilaments, requiring the use of additional procedures for microfilament polymerization inhibiting [11]. At the same time, it is known that the destruction of microfilaments in devitrified porcine oocytes may result from the cold exposure [29], that makes it possible to study the processes, where the microtubules are involved, without preliminary cytochalasin D inhibitor use.

Previously the highly dispersed silica was demonstrated to be involved into bond formation between different intracellular calcium stores in bovine spermatozoa [3]. The effect of prolactin, theophylline and guanine nucleotides (GTP and GDP) stimulated the  $Ca^{2+}$  release from intracellular stores of bovine oocytes [9, 10].

Proceeding from the mentioned above this research was aimed to study the  $Ca^{2+}$  release from intracellular stores of vitrified porcine oocytes under combined effect of prolactin and guanosine triphosphate, as well as theophylline and guanosine diphosphate in the presence of highly dispersed silica.

### Materials and methods

The research was done in the Landrace pig (*Sus scrofa domestica*) ovaries. The ovaries were at the stage of follicular growth and had no visible pathology. The oocyte-cumulus complexes were isolated from antral follicles (3–6 mm diameter) with widely branched capillary network, high turgor and transparent membrane. The rounded oocytes, surrounded by five or more layers of cumulus cells with a finely granular ooplasm and zona pellucida of an even width, were selected for experiments.

The isolated oocytes were incubated in a modified Dulbecco's medium (Sigma-Aldrich, USA) containing 36  $\mu\text{g/ml}$  Na pyruvate and 1  $\text{mg/ml}$   $CaCl_2$ -free glucose (further in the test as incubation medium). For oocyte vitrification we used the cryoprotectant mixtures, prepared in medium TC 199 (Sigma-Aldrich), containing 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma-Aldrich) such as: the mixture 1 – 0.7 M dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich) and 0.9 M ethylene glycol (EG, Sigma-Aldrich); the mixture 2 – 1.4 M DMSO and 1.8 M EG; the mixture 3 – 2.8 M DMSO, 3.6 M EG and 0.65 M trehalose (Sigma-Aldrich). The oocytes were subsequently exposed for 30 sec in the mixture 1 and 2 and then for 20 sec in the mixture 3. The oocytes in the mixture 3 were transferred into the straws, which were then immersed into liquid nitrogen for 1 day. For devitrification, the oocytes were warmed in water bath at 37°C for 5 sec. To remove the cryoprotectants, the oocytes were placed for 3 min





Выделенные ооциты инкубировали в модифицированной среде Дюльбекко («Sigma-Aldrich», США), содержащей 36 мкг/мл пирувата Na и 1 мг/мл глюкозы без CaCl<sub>2</sub> (далее по тексту – инкубационная среда). Для витрификации ооцитов использовали следующие смеси криопротекторов, приготовленные на среде TC-199 («Sigma-Aldrich»), содержащей 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (ЭБС, «Sigma-Aldrich»): смесь 1 – 0,7 М диметилсульфоксида (ДМСО, «Sigma-Aldrich») и 0,9 М этиленгликоля (ЭГ, «Sigma-Aldrich»); смесь 2 – 1,4 М ДМСО и 1,8 М ЭГ; смесь 3 – 2,8 М ДМСО; 3,6 М ЭГ и 0,65 М трегалозы («Sigma-Aldrich»). Ооциты последовательно выдерживали в течение 30 с в смесях 1 и 2, затем в течение 20 с – в смеси 3. Ооциты в смеси 3 переносили в соломины, которые погружали в жидкий азот на сутки. Для девитрификации ооциты отогревали на водяной бане при 37°C в течение 5 с. Для удаления криопротекторов ооциты помещали на 3 мин в 3 мл 0,25 М раствора трегалозы в среде TC-199, содержащей 10% ЭБС, а затем последовательно инкубировали в растворе трегалозы с 10% ЭБС: сначала в 0,25 М растворе в течение 5 мин, затем по минуте в 0,19 и 0,125 М растворах (37°C). На завершающем этапе клетки трижды отмывали в среде TC-199 с 10% ЭБС и перед измерением помещали не менее, чем на 60 мин в CO<sub>2</sub>-инкубатор (37°, 5% CO<sub>2</sub>).

Отогретье ооциты были разделены на группы: контрольную (без наночастиц высокодисперсного кремнезема (ВДК)) и экспериментальную (экспозиция в инкубационной среде в течение 30 мин при 38°C в присутствии 0,001% наночастиц ВДК марки А-300 (Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко, Украина)). К клеткам обеих групп последовательно добавляли 50 нг/мл пролактина, 10 мкМ гуанозинтрифосфата (ГТФ), теофиллин (1 мМ) и 50 мкМ гуанозиндифосфата (ГДФ) («Sigma-Aldrich») и инкубировали 10 мин при 38°C. Ооциты обрабатывали раствором 10 мкМ ингибитора полимеризации микротрубочек нокодазолом («Sigma-Aldrich») в течение часа при 38°C. Ингибитор протеинкиназы С (соединение Ro 31-8220) (10 нг/мл; «Sigma-Aldrich») воздействовал на клетки в течение 30 мин при 38°C. Во всех экспериментах в среду инкубации добавляли этиленгликоль тетраацетат (ЭГТА) («Sigma-Aldrich») в концентрации 0,5 мМ.

Концентрацию Ca<sup>2+</sup> во внутриклеточных депо ооцитов свиней измеряли с помощью флуоресцентного зонда хлортетрациклин (ХТЦ) («Sigma-Aldrich»). Перед проведением измерений ооциты очищали от клеток кумулюса препаративной иглой, затем 5 мин выдерживали при 38°C в инкубационной среде, содержащей 40 мкМ ХТЦ. Нагруженные клетки трижды отмывали в инку-

into 3 ml of 0.25 M trehalose solution in the medium TC 199, containing 10% FBS and then subsequently incubated in trehalose solution with 10% EBS, *i. e.* first in 0.25 M solution for 5 min, then by 1 min in 0.19 M and 0.125 M solutions (37°C). At the final stage, the cells were thrice washed in medium TC 199 with 10% FBS and placed in a CO<sub>2</sub> incubator (37°, 5% CO<sub>2</sub>) for at least 60 min before measuring.

The thawed oocytes were divided into the following groups: control (with no highly dispersed silica (HDS) nanoparticles) and experimental ones (exposed in incubation medium for 30 min at 38°C in the presence of 0.001% HDS A-300 nanoparticles (A.A. Chuyko Institute of Surface Chemistry, Ukraine)). The cells of both groups were successively supplemented with prolactin (50 ng/ml), guanosine triphosphate (GTP) (10 mM), theophylline (1 mM) and guanosine diphosphate (GDP) (50 μmM) (Sigma-Aldrich) and incubated for 10 min at 38°C. The oocytes were treated with a solution of 10 μM microtubule polymerization inhibitor nocodazole (Sigma-Aldrich) for one hour at 38°C. The protein kinase C inhibitor (compound Ro 31-8220) (10 ng/ml; Sigma-Aldrich) affected the cells within 30 min at 38°C. In all the experiments, the incubation medium was supplemented with ethylene glycol tetraacetate (EGTA) (Sigma-Aldrich) in 0.5 mM concentration.

The Ca<sup>2+</sup> concentration in intracellular stores of porcine oocytes was measured using the fluorescent probe chlorotetracycline (CTC) (Sigma-Aldrich). Before measuring, the oocytes were purified from cumulus cells with a dissecting needle, then incubated for 5 min at 38°C in incubation medium, containing 40 μM CTC. The loaded cells were thrice washed in incubation medium and transferred into a special quartz glass 0.05 ml cuvettes. The Ca<sup>2+</sup> concentration in oocytes was determined in incubation medium.

The fluorescence intensity of CTC in oocytes was measured in arbitrary units using fluorometric device, consisting of luminescent microscope LUMAM-II (LOMO, Russia), equipped with appropriate optical filters and photometric cap FMEL-1A (LOMO). The excitation spectrum of CTC-Ca<sup>2+</sup>-membrane complex was within the range of 380–400 nm, the fluorescence maximum was within 530 μm range. The duration of fluorescence excitation did not exceed 5 sec.

The significance of differences of the compared samples for 4–5 independent experiments was assessed using the Student's t-test after checking a normal distribution.

## Results and discussion

In frozen-thawed oocytes of the control group, the prolactin or GTP supplement stimulated the Ca<sup>2+</sup> mobilization from intracellular stores (Fig. 1A). A



бационной среде и переносили на специальное кварцевое стекло с ячейками объемом 0,05 мл. Концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  в ооцитах определяли в инкубационной среде.

Интенсивность флуоресценции ХТЦ в ооцитах измеряли в условных единицах с помощью флуориметрической установки, состоящей из люминесцентного микроскопа «Люмам-И1» («ЛОМО», Россия), снабженного соответствующими задаче светофильтрами и фотометрической насадкой «ФМЭЛ-1А» («ЛОМО»). Спектр возбуждения комплекса ХТЦ- $\text{Ca}^{2+}$ -мембрана находился в области 380–400 нм, максимум флуоресценции – в области 530 нм. Длительность возбуждения флуоресценции не превышала 5 с.

Значимость различий сравниваемых выборок для 4–5 независимых экспериментов оценивали с помощью t-критерия Стьюдента после проверки нормальности распределения.

### Результаты и обсуждение

В деконсервированных ооцитах контрольной группы добавление пролактина или ГТФ стимулировало мобилизацию  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо (рис. 1, А). Сочетанное действие данных веществ не вызывало дополнительный выход  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо ооцитов.

A. Gertler и соавт. [15] показали, что активация рецепторов к пролактину не стимулирует метаболизм фосфоинозитидов, в то же время D. Ra-

combined action of these substances caused no additional  $\text{Ca}^{2+}$  release from intracellular stores of oocytes.

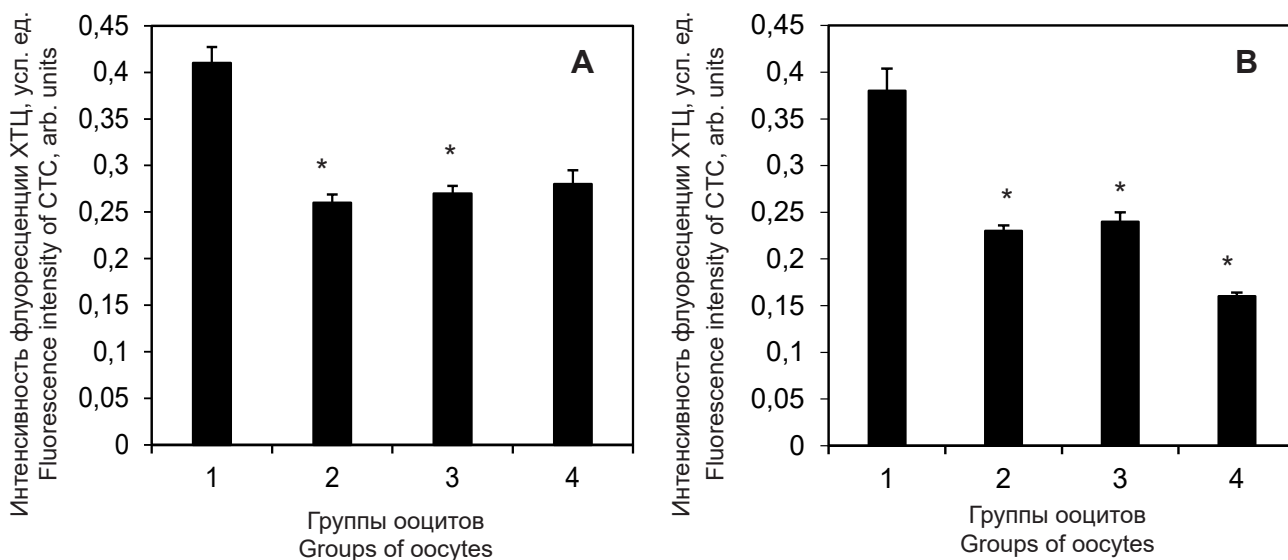
A. Gertler *et al.* [15] showed the activation of receptors to prolactin not to stimulate the metabolism of phosphoinositides, while D. Ratovondrahona *et al.* [26] found out a short increase in activation of  $\text{IP}_3$ -receptors under prolactin effect in cells.

In experimental cell group (supplemented with 0.001% of HDS nanoparticles) either the prolactin or GTP introduction into the incubation medium caused  $\text{Ca}^{2+}$  release from intracellular stores (Fig. 1B). Under a combined effect of prolactin and GTP in the presence of HDS nanoparticles the stimulation of an additional  $\text{Ca}^{2+}$  release from intracellular stores of oocytes was observed.

When supplementing the control cell group either with theophylline or GDP the  $\text{Ca}^{2+}$  released from the store (Fig. 2A). A combined effect of theophylline and GDP in oocytes resulted in no additional mobilization of  $\text{Ca}^{2+}$  from intracellular stores.

Theophylline increases an intracellular concentration of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) in different cell types [5]. In ovarian cells of Chinese hamster the cAMP causes the  $\text{Ca}^{2+}$  release from intracellular stores when  $\text{IP}_3$  receptors are activated [19], but in permeabilized cells of rat parotid glands it stimulates the  $\text{Ca}^{2+}$  release from intracellular stores by activating ryanodine receptors [30].

In the HDS group the presence of either theophylline or GDP in the incubation medium caused



**Рис. 1.** Влияние пролактина и ГТФ на высвобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо необработанных (А) и обработанных ВДК (В) девитрифицированных ооцитов свиней: 1 – контрольные клетки; 2 – активация 50 нг/мл пролактином; 3 – обработка 10 мкМ ГТФ; 4 – сочетанное действие пролактина и ГТФ. А – различия значимы между группами 1 и 2, 1 и 3 ( $P < 0,001$ ); В – различия значимы между группами 1 и 2, 1 и 3, 2 и 4, 3 и 4 ( $P < 0,001$ ).

**Fig. 1.** Effect of prolactin and GTP on  $\text{Ca}^{2+}$  release from intracellular stores of untreated (A) and HDS-treated (B) devitrified porcine oocytes: 1 – control cells; 2 – oocytes treated with 50 ng/ml prolactin; 3 – oocytes treated with 10  $\mu\text{M}$  GTP; 4 – combined effect of prolactin and GTP. A – the differences are significant between groups 1 and 2, 1 and 3 ( $P < 0.001$ ); B – the differences are significant between groups 1 and 2, 1 and 3, 2 and 4, 3 and 4 ( $P < 0.001$ ).



товондрагона и соавт. [26] установили, что при действии пролактина в клетках на короткое время повышается активация  $IP_3$ -рецепторов.

У экспериментальной группы клеток (добавление 0,001 % наночастиц ВДК) внесение в среду инкубации пролактина или ГТФ вызывало высвобождение  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо (рис. 1, В). При сочетанном действии пролактина и ГТФ в присутствии наночастиц ВДК наблюдалась стимуляция добавочного выхода  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо ооцитов.

При добавлении к контрольной группе клеток теofilлина или ГДФ происходил выход  $Ca^{2+}$  из депо (рис. 2, А). Сочетанное действие теofilлина и ГДФ в ооцитах не приводило к дополнительной мобилизации  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо.

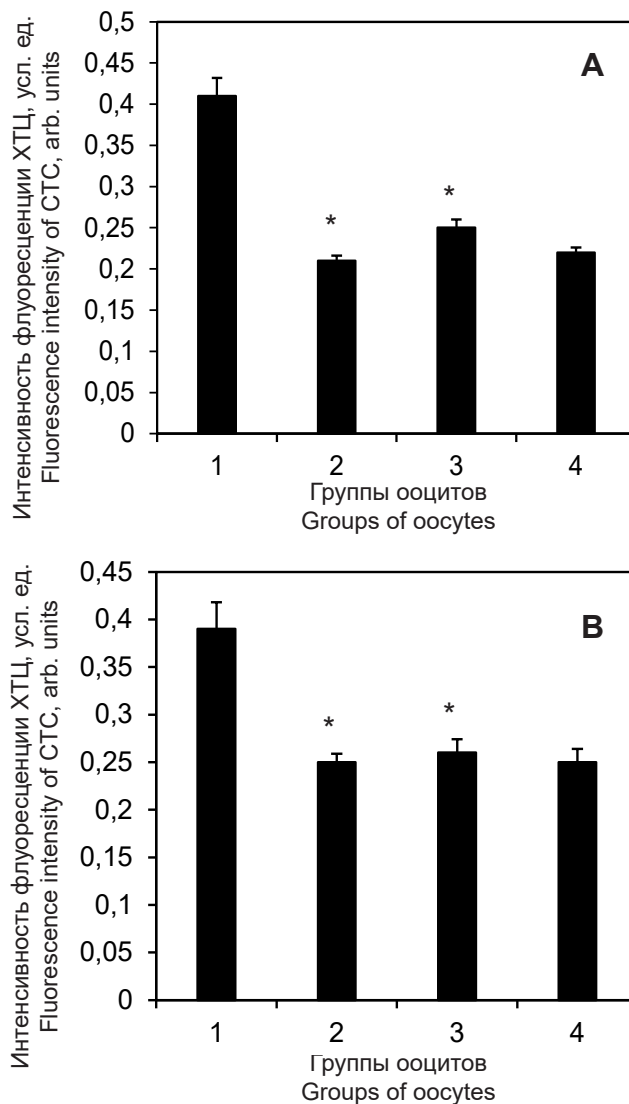
В клетках различного типа теofilлин увеличивает внутриклеточную концентрацию циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) [5]. В овариальных клетках китайского хомячка цАМФ вызывает высвобождение  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо при активации  $IP_3$ -рецепторов [19], а в пермебилизированных клетках околоушных желез крыс стимулирует высвобождение  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо, активируя рианодинорые рецепторы [30].

В группе клеток с ВДК присутствие в среде инкубации теofilлина или ГДФ вызывало выход  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо (рис. 2, В). Если при сочетанном действии пролактина и ГТФ добавление наночастиц ВДК стимулировало дополнительное высвобождение  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо ооцитов, то в присутствии теofilлина и ГДФ данный эффект отсутствовал.

После внесения пролактина и ГТФ во всех предварительно обработанных наночастицами ВДК клетках был обнаружен дополнительный выход  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо (рис. 3). В случае дополнительной обработки клеток ингибитором полимеризации микротрубочек нокодазолом отмечалось снижение высвобождения  $Ca^{2+}$  из внутриклеточного депо. Аналогичный эффект наблюдался при добавлении к ооцитам, предварительно обработанным ингибитором протеинкиназы С (соединение Ro 31-8220), пролактина и ГДФ.

К.М. Lowther и соавт. [22] было отмечено, что криоконсервирование методом витрификации не влияет на структуру ЭПР ооцитов на стадии зародышевого пузырька, однако в процессе дальнейшего созревания гамет нарушается способность ЭПР к реорганизации, что, в свою очередь, может быть причиной снижения способности клеток к развитию [12, 20].

Согласно гипотезе Т.К. Ghosh и J.M. Mullaney [16, 25] ГТФ образует связь между различными



**Рис. 2.** Влияние теofilлина и ГДФ на высвобождение  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо необработанных (А) и обработанных ВДК (В) девитрифицированных ооцитов свиней: 1 – контрольные клетки; 2 – активация 1 мМ теofilлином; 3 – 50 мкМ ГДФ; 4 – сочетанное действие теofilлина и ГДФ. Различия значимы между группами 1 и 2, 1 и 3 ( $P < 0,001$ ).

**Fig. 2.** Effect of theophylline and GDP on  $Ca^{2+}$  release from intracellular stores of untreated (A) and HDS-treated (B) devitrified porcine oocytes: 1 – control cells; 2 – oocytes treated with 1 mM theophylline; 3 – oocytes treated with 50 μM GDP; 4 – combined effect of theophylline and GDP. The differences are significant between groups 1 and 2, 1 and 3 ( $P < 0.001$ ).

the  $Ca^{2+}$  release from intracellular stores (Fig. 2B). If under a combined effect of prolactin and GTP the supplement of HDS nanoparticles stimulated an additional  $Ca^{2+}$  release from intracellular stores of oocytes, then with theophylline and GDP this effect was absent.

After introducing prolactin and GTP an additional  $Ca^{2+}$  release from intracellular stores was revealed in all the HDS particles-pretreated cells (Fig. 3). In

внутриклеточными депо  $Ca^{2+}$  ( $IP_3$ -независимыми и  $IP_3$ -зависимыми) и обеспечивает его переход из  $IP_3$ -нечувствительных внутриклеточных депо в  $IP_3$ -чувствительные. В результате происходит дополнительное высвобождение  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо. Благодаря способности ГТФ к объединению ранее несвязанных между собой внутриклеточных депо  $Ca^{2+}$ ,  $IP_3$ -рецепторы могут высвобождать  $Ca^{2+}$  из ранее недоступных внутриклеточных депо. Отсутствие ГТФ ограничивает эффект агониста на высвобождение  $Ca^{2+}$  из депо и на его распространение внутри клетки. В присутствии ГТФ происходит активация клетки вследствие значительного выхода  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо [17].

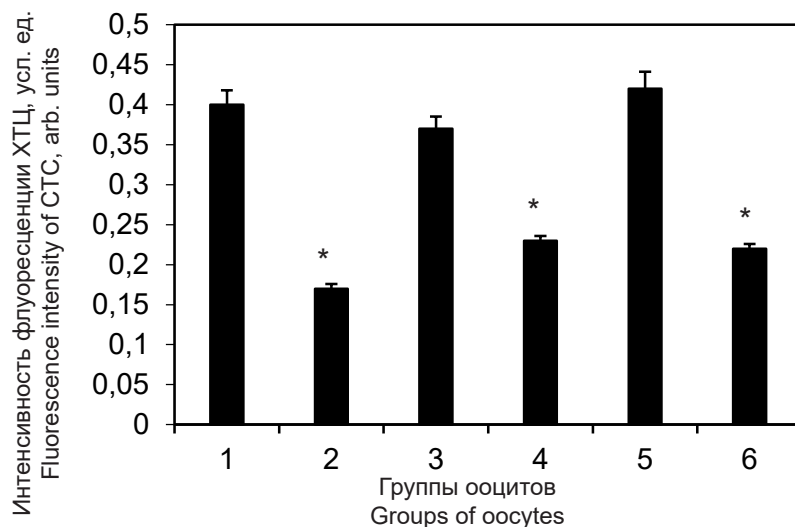
Ранее на интактных ооцитах свиней нами было показано, что при сочетанном действии пролактина и ГТФ происходит дополнительный выход  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо. Пролактин, который обладает сходным с  $IP_3$  эффектом, активирует высвобождение  $Ca^{2+}$  из  $IP_3$ -чувствительных внутриклеточных депо [3]. На ооцитах свиней для обеспечения входа ГТФ и ГДФ внутрь клеток использовали ХТЦ [2]. В деконсервированных ооцитах свиней при сочетанном действии пролактина и ГТФ дополнительная мобилизация  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо отсутствовала, что, возможно, объясняется разрывом связи между  $IP_3$ -чувствительными и  $IP_3$ -нечувствительными внутриклеточными депо  $Ca^{2+}$ .

Элементы цитоскелета (микротрубочки и микрофиламенты) могут участвовать в мобилизации  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо. Установлено, что при разрушении цитоскелета в тромбоцитах человека снижается связывание  $IP_3$  с рецепторами на ЭПР [10], в отличие от NIH 3T3 фибробластов, в которых деструкция цитоскелета не затрагивает этот процесс [26]. На интактных ооцитах свиней было показано, что в дополнительном высвобождении  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо при совместном действии пролактина и ГТФ участвуют микротрубочки [4]. На основании данного факта можно предположить, что в девитрифицированных ооцитах свиней добавочный выход  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо при сочетанном действии пролактина и ГТФ отсутствует из-за разрушения микро-

case of additional cell treatment with the microtubule polymerization inhibitor nocodazole a decrease in  $Ca^{2+}$  release from an intracellular store was noted. A similar effect we observed when supplementing prolactin and GDP to the oocytes, pretreated with protein kinase C inhibitor (compound Ro 31-8220).

K.M. Lowther *et al.* [22] reported the cryopreservation by vitrification as not to affect the EPR structure of oocytes at the germinal vesicle stage, but during further gamete maturation the capability of EPR to reorganization is disordered, which in turn may cause a decrease in cell capability to develop [12, 20].

According to the hypothesis of T.K. Ghosh and J.M. Mullaney [16, 25] the GTP forms a bond between different intracellular  $Ca^{2+}$  stores ( $IP_3$ -independent and  $IP_3$ -dependent ones) and provides its transition from  $IP_3$ -insensitive intracellular stores to  $IP_3$ -sensitive ones. As a result, an additional  $Ca^{2+}$  release from intracellular stores occurs. Due to the GTP capability to unite the previously unbound intracellular  $Ca^{2+}$  stores, the  $IP_3$  receptors may release  $Ca^{2+}$  from the previously inaccessible intracellular stores. The absence of GTP limits the effect of agonist on  $Ca^{2+}$  release from the store and its spread within a cell. In the GTP presence the cell activation due to a significant  $Ca^{2+}$  release from intracellular stores occurs [17].



**Рис. 3.** Влияние нокодазола и Ro 31-8220 на стимулированное пролактином и ГТФ освобождение  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо девитрифицированных ооцитов свиней: 1 – контрольные клетки; 2 – сочетанное действие пролактина и ГТФ; 3 – 10 мкМ нокодазола; 4 – нокодазол и последующее сочетанное действие пролактина и ГТФ; 5 – 10 нг/мл Ro 31-8220; 6 – Ro 31-8220 и последующее сочетанное действие пролактина и ГТФ. Различия значимы между группами 1 и 2, 3 и 4, 5 и 6, 2 и 4, 2 и 6 ( $P < 0,001$ ).

**Fig. 3.** Effect of nocodazole and Ro 31-8220 on prolactin- and GTP-stimulated  $Ca^{2+}$  release from intracellular stores of devitrified porcine oocytes: 1 – control cells; 2 – combined effect of prolactin and GTP; 3 – 10  $\mu$ M no-codazole; 4 – nocodazol and subsequent combined effect of prolactin and GTP; 5 – 10 ng/ml Ro 31-8220; 6 – Ro 31-8220 and subsequent combined effect of prolactin and GTP. The differences are significant between groups 1 and 2, 3 and 4, 5 and 6, 2 and 4, 2 and 6 ( $P < 0.001$ ).





трубочек. Ранее было установлено, что витрификация и последующий отогрев приводят к разрушению микрофиламентов и не затрагивают микротрубочки [7, 14].

Кроме того, причиной отсутствия дополнительной мобилизации  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо витрифицированных ооцитов свиней при сочетанном действии пролактина и ГТФ может быть неспособность ГТФ к образованию связи между различными внутриклеточными депо  $Ca^{2+}$ . В данном случае целесообразно использование ВДК, который может, как и ГТФ, образовывать связь между различными внутриклеточными депо. Данное вещество участвует в образовании связей между различными внутриклеточными депо при сочетанном действии пролактина и ГТФ. Наночастицы ВДК входят в состав многих лекарственных средств, используемых в биомедицине и животноводстве. В экспериментах на сперматозоидах быков было показано, что ВДК способствует формированию связи между различными внутриклеточными депо  $Ca^{2+}$  [1], а его присутствие при криоконсервировании спермы повышает выживаемость клеток после отогрева [6].

При введении ингибитора полимеризации микротрубочек нокодазола эффект дополнительного высвобождения  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо, стимулированного сочетанным действием пролактина и ГТФ при введении ВДК, отсутствовал.

На основании вышеизложенного можно заключить, что в криоконсервированных методом витрификации ооцитах свиней микротрубочки сохраняются. В то же время при сочетанном действии теофиллина и ГДФ (в присутствии и без ВДК) дополнительного высвобождения  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо не наблюдается. Поскольку при сочетанном действии теофиллина и ГДФ, направленном на дополнительное высвобождение  $Ca^{2+}$  в ооцитах свиней, участвуют микрофиламенты [4], то отсутствие дополнительного высвобождения  $Ca^{2+}$  в криоконсервированных клетках свиней может быть признаком разрушения системы микрофиламентов. Ранее С. Rojas и соавт. [29] на ооцитах свиней также установили, что криоконсервирование не влияет на целостность микротрубочек, но вызывает деструкцию микрофиламентов.

Результаты наших экспериментов на витрифицированных ооцитах свиней показали, что в присутствии наночастиц ВДК при сочетанном действии пролактина и ГТФ из внутриклеточных депо дополнительно высвобождается  $Ca^{2+}$ , что свидетельствует об его участии в образовании связи между различными внутриклеточными депо. Если цитоскелет разрушен после витрификации

Previously, in intact porcine oocytes we found an additional  $Ca^{2+}$  release from intracellular stores to occur under combined effect of prolactin and GTP. The prolactin, possessing an  $IP_3$ -like effect, activates the  $Ca^{2+}$  release from  $IP_3$ -sensitive intracellular stores [10]. In porcine oocytes we used the CTC to provide the GTP and GDP entry into the cells [9]. In frozen-thawed porcine oocytes under a combined effect of prolactin and GTP, there was no additional  $Ca^{2+}$  mobilization from intracellular stores, which probably might be explained by a bond rupture between  $IP_3$ -sensitive and  $IP_3$ -insensitive intracellular  $Ca^{2+}$  stores.

Cytoskeletal elements (microtubules and microfilaments) may participate in  $Ca^{2+}$  mobilization from intracellular stores. The  $IP_3$  binding to receptors on EPR was established to reduce in human platelets under cytoskeleton destruction [5], in contrast to NIH 3T3 fibroblasts, where cytoskeletal destruction had no effect on this process [26]. In the intact porcine oocytes the microtubules were shown to be involved into additional  $Ca^{2+}$  release from intracellular stores under combined effect of prolactin and GTP [11]. Proceeding from this fact we may assume no additional  $Ca^{2+}$  release from intracellular stores under a combined effect of prolactin and GTP in devitrified porcine oocytes to result from microtubule destruction. Previously the vitrification and subsequent thawing were demonstrated as resulting in microfilament destruction and not affecting microtubules [1, 14].

In addition, the lack of additional  $Ca^{2+}$  mobilization from intracellular stores of vitrified porcine oocytes under prolactin and GTP combined effect may result from inability of GTP to form a bond between different intracellular  $Ca^{2+}$  stores. In this case, it is expedient to use HDS, which is capable, like GTP, to form a bond between different intracellular stores. This substance participates in formation of the bonds between different intracellular stores under a combined effect of prolactin and GTP. The HDS nanoparticles are the components of many medicines, used in biomedicine and animal breeding. In the experiments in bovine spermatozoa, the HDS was shown to promote the bond formation between different intracellular  $Ca^{2+}$  stores [3], and its presence during sperm cryopreservation increased cell survival after thawing [7].

When introducing the microtubule polymerization inhibitor nocodazole no effect of additional  $Ca^{2+}$  release from intracellular stores, stimulated by a combined effect of prolactin and GTP in HDS presence, was observed.

Proceeding from the mentioned above, the microtubules may be suggested as preserved in porcine oocytes, cryopreserved by means of vitrification. At the same time, under a combined effect of theophylline



и отогрева, наночастицы ВДК не стимулируют образование связи между различными внутриклеточными депо кальция. Таким образом, при образовании связи между различными депо ВДК может заменить ГТФ или ГДФ, но не способен заменить микрофиламенты, разрушенные при замораживании.

В регуляции содержания кальция во внутриклеточных депо, кроме элементов цитоскелета, участвует и протеинкиназа С. Установлено, что активатор протеинкиназы С форболмиристилacetат способен контролировать содержание  $\text{Ca}^{2+}$  во внутриклеточных депо путем регуляции  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов плазматической мембраны клетки [27, 28]. На девитрифицированных ооцитах свиней нами было показано, что при сочетанном действии пролактина и ГТФ в присутствии наночастиц ВДК протеинкиназа С также участвует в дополнительном высвобождении  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо.

Таким образом, в ооцитах свиней после витрификации и последующего отогрева нарушается связь между различными внутриклеточными депо кальция вследствие деструкции микрофиламентов и неспособности ГТФ образовывать связь между различными депо кальция. В данном случае высокодисперсный кремнезем может заменить ГТФ при образовании связи между различными внутриклеточными депо, но не способен восстановить разрушенные холодом микрофиламенты.

Дальнейшие наши исследования будут направлены на изучение механизма действия ВДК на криоконсервированные ооциты с целью ускорения их восстановления.

## Выводы

1. Показано, что витрификация и отогрев ооцитов свиней приводят к нарушению связи между различными внутриклеточными депо  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{IP}_3$ -чувствительными и рианодинчувствительными), в обеспечении которой участвуют микрофиламенты.

2. Выявлено, что связь между различными внутриклеточными депо  $\text{Ca}^{2+}$  в девитрифицированных ооцитах свиней, образуемая с помощью микротрубочек, сохраняется, но претерпевает некоторые изменения. При этом ГТФ (в отличие от наночастиц ВДК) не участвует в образовании связи между различными внутриклеточными депо  $\text{Ca}^{2+}$ .

3. Установлено, что в образовании связи между различными внутриклеточными депо  $\text{Ca}^{2+}$  в девитрифицированных ооцитах, кроме микротрубочек, участвует и протеинкиназа С.

and GDP (with and without HDS), no additional  $\text{Ca}^{2+}$  release from intracellular stores was observed. Since a combined effect of theophylline and GDP, aimed at an additional  $\text{Ca}^{2+}$  release in porcine oocytes, involves microfilaments [11], no  $\text{Ca}^{2+}$  additional release in cryopreserved porcine cells may testify to the microfilament system destruction. Previously, C. Rojas *et al.* [29] established the cryopreservation to have no effect on microtubule integrity in porcine oocytes, but caused the microfilament destruction.

Our findings in vitrified porcine oocytes showed an additional  $\text{Ca}^{2+}$  release from intracellular stores at the presence of HDS nanoparticles under a combined effect of prolactin and GTP, which testified to its participation in a bond formation between different intracellular stores. If the cytoskeleton is destroyed after vitrification and thawing, the HDS nanoparticles do not stimulate a bond formation between different intracellular calcium stores. Thus, HDS may replace either GTP or GDP under a bond formation between different stores, but not microfilaments, destroyed in freezing.

In addition to cytoskeleton elements, the protein kinase C is also involved into calcium content regulation in intracellular stores. The protein kinase C activator phorbol myristate acetate was established to be capable to control the  $\text{Ca}^{2+}$  content in intracellular store by regulating  $\text{Ca}^{2+}$  channels of cell plasma membrane [27, 28]. In devitrified porcine oocytes we demonstrated the protein kinase C to be also involved into additional  $\text{Ca}^{2+}$  release from intracellular stores under prolactin and GTP combined effect in presence of HDS nanoparticles.

Thus, in porcine oocytes after vitrification and subsequent thawing the bond between different intracellular calcium stores is disordered because of microfilament destruction and GTP inability to form a bond between different calcium stores. In this case, the highly disperse silica may replace GTP in forming a bond between different intracellular stores, but it is unable to recover the cold-destroyed microfilaments.

Further we are planning to study the mechanism of HDS effect on cryopreserved oocytes in order to accelerate the recovery of cryopreserved cells.

## Conclusions

1. The vitrification and thawing of porcine oocytes were demonstrated to result in disorder of a bond between different intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores ( $\text{IP}_3$ -sensitive and ryanodine sensitive ones), in ensuring of which the microfilaments were involved.

2. It was revealed that the bond between different intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores in devitrified porcine oocytes, formed by means of microtubules, was preserved, but



## Литература

1. Бойцева Е.Н., Денисенко В.Ю., Кузьмина Т.И. Оценка показателей постэякуляционного созревания сперматозоидов *Bos Taurus* хлортетрациклиновым тестом. *Онтогенез* 2015; 46(6): 1–7.
2. Денисенко В.Ю., Кузьмина Т.И. Эффект гуаниновых нуклеотидов и протеинкиназы С на стимулированное пролактином освобождение  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо ооцитов свиней. *Онтогенез* 2005; 36(3): 1–6.
3. Денисенко В.Ю., Кузьмина Т.И. Влияние ингибирования рианодиновых и IP3-чувствительных рецепторов, а также протеинкиназы С на освобождение  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо ооцитов свиней при их активации пролактином и GTP. *Цитология* 2007; 49(8): 685–689.
4. Денисенко В.Ю., Кузьмина Т.И. Участие элементов цитоскелета в мобилизации  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо интактных и девитрифицированных ооцитов свиней. *Рос. физиол. журнал им. И.М. Сеченова* 2016; 102(4): 480–489.
5. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. *Справочник биохимика*. Москва: Мир; 1991. 543 с.
6. Чуйко А.А. *Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния*. Киев: Наукова думка; 2003. 417 с.
7. Albarracín J.L., Morató R., Rojas C. et al. Effects of vitrification in open pulled straws on the cytology of in vitro matured prepubertal and adult bovine oocytes. *Theriogen* 2005; 63(3): 890–901.
8. Berridge M.J. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium* 2002; 32(5–6): 235–249.
9. Borini A., Cattoli M., Bulletti C. et al. Clinical efficiency of oocyte and embryo cryopreservation. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1127: 49–58.
10. Bourguignon L.Y., Iida N., Jin H. The involvement of the cytoskeleton in regulating IP3 receptor-mediated internal  $Ca^{2+}$  release in human blood platelets. *Cell Biol Int* 1993; 17(8): 751–758.
11. Chen S.U., Lien Y.R., Chao K.H. et al. Effects of cryopreservation on meiotic spindles of oocytes and its dynamics after thawing: clinical implications in oocyte freezing – a review article. *Mol Cell Endocrinol* 2003; 202: 101–107.
12. Diez C., Duque P., Gómez E. et al. Bovine oocyte vitrification before or after meiotic arrest: effects on ultrastructure and developmental ability. *Theriogen* 2005; 64(2): 317–333.
13. Egerszegi I., Somfai T., Nakai M. et al. Comparison of cytoskeletal integrity, fertilization and developmental competence of oocytes vitrified before or after in vitro maturation in a porcine model. *Criobiology* 2013; 67(3): 287–292.
14. FitzHarris G., Marangos P., Carroll J. Changes in endoplasmic reticulum structure during mouse oocyte maturation are controlled by the cytoskeleton and cytoplasmic dynein. *Dev Biol* 2007; 305(1): 133–144.
15. Gertler A., Friesen H.G. Human growth hormone-stimulated mitogenesis of Nb2 node lymphoma cells is not mediated by an immediate acceleration of phosphoinositide metabolism. *Mol Cell Endocrinol* 1986; 48(2–3): 221–228.
16. 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; 340: 236–239.
17. Hajnoczky G., Lin C., Thomas A.P. Luminal communication between intracellular calcium stores modulated by GTP and the cytoskeleton. *J Biol Chem* 1994; 269(14): 10280–10287.
18. Hirose M., Kamoshita M., Fujiwara K. et al. Vitrification procedure decreases inositol 1,4,5-trisphosphate receptor expression, resulting in low fertility of pig oocytes. *Anim Sci J* 2013; 84(10): 693–701.
19. Ikeda M., Nelson C.S., Shinagawa H. et al. Cyclic AMP regulates the calcium transients released from IP3-sensitive stores by underwent some changes. Herewith the GTP (unlike HDS nanoparticles) was not involved into a bond formation between different intracellular  $Ca^{2+}$  stores.
3. In addition to microtubules the protein kinase C was established to be also involved into a bond formation between different intracellular  $Ca^{2+}$  stores in devitrified oocytes.

## References

1. Albarracín J.L., Morató R., Rojas C. et al. Effects of vitrification in open pulled straws on the cytology of in vitro matured prepubertal and adult bovine oocytes. *Theriogen* 2005; 63(3): 890–901.
2. Berridge M.J. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium* 2002; 32(5–6): 235–249.
3. Boitseva E.N., Denisenko V.Yu., Kuzmina T.I. Evaluation of indicators of postejaculation maturation of spermatozoa of *Bos taurus* using a chlortetracycline test. *Rus J Devel Biol* 2015; 46(4): 362–367.
4. Borini A., Cattoli M., Bulletti C. et al. Clinical efficiency of oocyte and embryo cryopreservation. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1127: 49–58.
5. Bourguignon L.Y., Iida N., Jin H. The involvement of the cytoskeleton in regulating IP3 receptor-mediated internal  $Ca^{2+}$  release in human blood platelets. *Cell Biol Int* 1993; 17(8): 751–758.
6. Chen S.U., Lien Y.R., Chao K.H. et al. Effects of cryopreservation on meiotic spindles of oocytes and its dynamics after thawing: clinical implications in oocyte freezing – a review article. *Mol Cell Endocrinol* 2003; 202: 101–107.
7. Chuiko A.A. *Medical chemistry and clinical application of silicon dioxide*. Kyiv: Naukova Dumka; 2003.
8. Dawson R., Elliot D., Elliot W. et al. *Handbook of biochemist*. Moscow: Mir; 1991.
9. Denisenko V.Yu., Kuzmina T.I. Effects of guanine nucleotides and protein kinase C on prolactin-stimulated release of  $Ca^{2+}$  from intracellular stores of pig oocytes. *Rus J Devel Biol* 2005; 36(3): 161–165.
10. Denisenko V.Yu., Kuzmina T.I. Influence inhibiting of ryanodine and inositol triphosphate receptors, and protein kinase C in  $Ca^{2+}$  exit from intracellular stores of porcine oocytes stimulation by prolactin and GTP. *Tsitologiya* 2007; 49(8): 685–689.
11. Denisenko V.Yu., Kuzmina T.I. The participation of the elements of cytoskeleton in the mobilization of  $Ca^{2+}$  from intracellular stores of intact and devitrified porcine oocytes. *R J Physiol* 2016; 102(4): 480–489.
12. Diez C., Duque P., Gómez E. et al. Bovine oocyte vitrification before or after meiotic arrest: effects on ultrastructure and developmental ability. *Theriogen* 2005; 64(2): 317–333.
13. Egerszegi I., Somfai T., Nakai M. et al. Comparison of cytoskeletal integrity, fertilization and developmental competence of oocytes vitrified before or after in vitro maturation in a porcine model. *Criobiology* 2013; 67(3): 287–292.
14. FitzHarris G., Marangos P., Carroll J. Changes in endoplasmic reticulum structure during mouse oocyte maturation are controlled by the cytoskeleton and cytoplasmic dynein. *Dev Biol* 2007; 305(1): 133–144.
15. Gertler A., Friesen H.G. Human growth hormone-stimulated mitogenesis of Nb2 node lymphoma cells is not mediated by an immediate acceleration of phosphoinositide metabolism. *Mol Cell Endocrinol* 1986; 48(2–3): 221–228.
16. 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; 340: 236–239.



- activation of rat kappa-opioid receptors expressed in CHO cells. *Cell Calcium* 2001; 29(1): 39–48.
20. Kubota C., Yang X., Dinnyes A. et al. In vitro and in vivo survival of frozen-thawed bovine oocytes after IVF, nuclear transfer, and parthenogenetic activation. *Mol Reprod Dev* 1998; 51(3): 281–286.
  21. Larman M.G., Sheehan C.B., Gardner D.K. Calcium-free vitrification reduces cryoprotectant-induced zona pellucida hardening and increases fertilization rates in mouse oocytes. *Reprod* 2006; 131(1): 53–61.
  22. Lowther K.M., Weitzman V.N., Maier D. et al. Maturation, fertilization, and the structure and function of the endoplasmic reticulum in cryopreserved mouse oocytes. *Biol Reprod* 2009; 81(1): 147–154.
  23. Machaty Z., Funahashi H., Day B.N. et al. Developmental changes in the intracellular Ca<sup>2+</sup> release mechanisms in porcine oocytes. *Biol Reprod* 1997; 56(4): 921–930.
  24. Michelangeli F., Ogunbayo O.A., Wootton L.L. A plethora of interacting organellar Ca<sup>2+</sup> stores. *Cur Opin Cell Biol* 2005; 17(2): 135–140.
  25. 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; 262(28): 13865–13872.
  26. Ratovondrahona D., Fournier B., Odessa M.F. et al. Prolactin stimulation of phosphoinositide metabolism in CHO cells stably expressing the PRL receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 243(1): 127–130.
  27. Ribeiro C.M., Reece J., Putney J.W.Jr. Role of the cytoskeleton in calcium signaling in NIH 3T3 cells. An intact cytoskeleton is required for agonist-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> signaling, but not for capacitative calcium entry. *J Biol Chem* 1997; 272(42): 26555–26561.
  28. Ribeiro C.M., McKay R.R., Hosoki E. et al. Effects of elevated cytoplasmic calcium and protein kinase C on endoplasmic reticulum structure and function in HEK293 cells. *Cell Calcium* 2000; 27(3): 175–185.
  29. Rojas C., Palomo M.J., Albarracin J.J. et al. Vitrification of immature and in vitro matured pig oocytes: study of distribution of chromosomes, microtubules and microfilaments. *Criobiol* 2004; 49(3): 211–220.
  30. Rubin R.P., Adolf M.A. Cyclic AMP regulation of calcium mobilization and amylase release from isolated permeabilized rat parotid cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 268(2): 600–606.
  31. Sathananthan A.H., Ng S.C., Trounson A.O. et al. The effects of ultrarapid freezing on meiotic and mitotic spindles of mouse oocytes and embryos. *Gamete Res* 1988; 21(4): 385–401.
  32. Schlaitz A.L. Microtubules as key coordinators of nuclear envelope and endoplasmic reticulum dynamics during mitosis. *Bioessays* 2014; 36(7): 665–671.
  33. Somfai T., Kikuchi K., Nagai T. Factors affecting cryopreservation of porcine oocytes. *J Reprod Dev* 2012; 58(1): 17–24.
  34. Terasaki M., Chen L.B., Fujiwara K. Microtubules and the endoplasmic reticulum are highly interdependent structures. *J Cell Biol* 1986; 103(4): 1557–1568.
  17. Hajnoczky G., Lin C., Thomas A.P. Luminal communication between intracellular calcium stores modulated by GTP and the cytoskeleton. *J Biol Chem* 1994; 269(14): 10280–10287.
  18. Hirose M., Kamoshita M., Fujiwara K. et al. Vitrification procedure decreases inositol 1,4,5-trisphosphate receptor expression, resulting in low fertility of pig oocytes. *Anim Sci J* 2013; 84(10): 693–701.
  19. Ikeda M., Nelson C.S., Shinagawa H. et al. Cyclic AMP regulates the calcium transients released from IP<sub>3</sub>-sensitive stores by activation of rat kappa-opioid receptors expressed in CHO cells. *Cell Calcium* 2001; 29(1): 39–48.
  20. Kubota C., Yang X., Dinnyes A. et al. In vitro and in vivo survival of frozen-thawed bovine oocytes after IVF, nuclear transfer, and parthenogenetic activation. *Mol Reprod Dev* 1998; 51(3): 281–286.
  21. Larman M.G., Sheehan C.B., Gardner D.K. Calcium-free vitrification reduces cryoprotectant-induced zona pellucida hardening and increases fertilization rates in mouse oocytes. *Reprod* 2006; 131(1): 53–61.
  22. Lowther K.M., Weitzman V.N., Maier D. et al. Maturation, fertilization, and the structure and function of the endoplasmic reticulum in cryopreserved mouse oocytes. *Biol Reprod* 2009; 81(1): 147–154.
  23. Machaty Z., Funahashi H., Day B.N. et al. Developmental changes in the intracellular Ca<sup>2+</sup> release mechanisms in porcine oocytes. *Biol Reprod* 1997; 56(4): 921–930.
  24. Michelangeli F., Ogunbayo O.A., Wootton L.L. A plethora of interacting organellar Ca<sup>2+</sup> stores. *Cur Opin Cell Biol* 2005; 17(2): 135–140.
  25. 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; 262(28): 13865–13872.
  26. Ratovondrahona D., Fournier B., Odessa M.F. et al. Prolactin stimulation of phosphoinositide metabolism in CHO cells stably expressing the PRL receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 243(1): 127–130.
  27. Ribeiro C.M., Reece J., Putney J.W.Jr. Role of the cytoskeleton in calcium signaling in NIH 3T3 cells. An intact cytoskeleton is required for agonist-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> signaling, but not for capacitative calcium entry. *J Biol Chem* 1997; 272(42): 26555–26561.
  28. Ribeiro C.M., McKay R.R., Hosoki E. et al. Effects of elevated cytoplasmic calcium and protein kinase C on endoplasmic reticulum structure and function in HEK293 cells. *Cell Calcium* 2000; 27(3): 175–185.
  29. Rojas C., Palomo M.J., Albarracin J.J. et al. Vitrification of immature and in vitro matured pig oocytes: study of distribution of chromosomes, microtubules and microfilaments. *Criobiol* 2004; 49(3): 211–220.
  30. Rubin R.P., Adolf M.A. Cyclic AMP regulation of calcium mobilization and amylase release from isolated permeabilized rat parotid cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 268(2): 600–606.
  31. Sathananthan A.H., Ng S.C., Trounson A.O. et al. The effects of ultrarapid freezing on meiotic and mitotic spindles of mouse oocytes and embryos. *Gamete Res* 1988; 21(4): 385–401.
  32. Schlaitz A.L. Microtubules as key coordinators of nuclear envelope and endoplasmic reticulum dynamics during mitosis. *Bioessays* 2014; 36(7): 665–671.
  33. Somfai T., Kikuchi K., Nagai T. Factors affecting cryopreservation of porcine oocytes. *J Reprod Dev* 2012; 58(1): 17–24.
  34. Terasaki M., Chen L.B., Fujiwara K. Microtubules and the endoplasmic reticulum are highly interdependent structures. *J Cell Biol* 1986; 103(4): 1557–1568.

