

Т.Ю. Вознесенська, Т.В. Блашків

Вплив NO на мейотичне дозрівання ооцитів мишей *in vitro*

*Известно, что преимплантационный период важен для нормального развития зародыша мыши. Влияние NO на процесс мейотического созревания ооцитов млекопитающих остается до конца не выясненным. Исследовано влияние донора NO, блокатора NO-синтазы на мейотическое созревание ооцитов мышей. Показано, что активность ооцитарных NOS необходима для осуществления мейотического созревания ооцитов; NO влияет на процесс возобновления мейоза ооцитами. Полученные результаты свидетельствуют, что NO является ключевым медиатором мейотического созревания ооцитов *in vitro*.*

ВСТУП

Оксид азоту (NO) – вільнорадикальний газ, який виконує численні функції в різних тканинах. До найбільш вивчених відносять участь у функціонуванні судинного ендотелію, у бактеріоцидному та протипухлинному ефектах лейкоцитів і у різноманітних нейрональних функціях [5]. Оскільки нервові, судинні й імунні клітини є невід’ємним компонентом репродуктивних органів, то NO правомірно розглядати як важливий регулятор фізіологічних процесів репродуктивної системи [9 – 11,15]. NO продукується з L-аргініну за участі ферменту цитозоля NO-синтази (NOS). Показано, що остання здатна зв’язуватися з зовнішньою мембраною клітини і у разі необхідності повертатися назад у цитоплазму [17]. Існують два класи NO-синтаз: конститутивна (cNOS: eNOS і nNOS), що експресується постійно і потребує кальцій/кальмодулін як кофактор, та індукцибельна (iNOS), що продукує NO у разі потреби, і є незалежна від кальцію [13]. Біохімічно та імуногістохімічно доведена наявність NO-синтаз (iNOS і cNOS) як у чоловічих, так і в жіночих репродуктивних органах [6]. Крім того, імунофлуоресцент-

но показано існування eNOS на поверхні оваріальних і овульованих ооцитів, отриманих від безпородних мишей, але не від мишей, у яких ген для eNOS було ушкоджено (“eNOS knock-out”) [11]. За наявності L-цитруліну, визначено активність NOS у перепелиних ооцитах [16]. Показано, що підвищення концентрації NO у фолікулярній рідині позитивно корелює з розміром фолікула [14]. Відомо, що втрата гена eNOS зумовлює зменшення маси яєчників і кількості овульованих ооцитів порівняно з такими у безпородних мишей [11]. Доведено, що NO може функціонувати як вазодилататор, котрий ініціює збільшення течії крові в яєчнику, що є важливим для здійснення овуляції [7]. Роль NO в мейотичному дозріванні оваріальних ооцитів потребує подальшого вивчення.

Метою нашої роботи було дослідження впливу донора NO (нітропрусиду натрію), блокатора NO-синтаз (N^G-монометил-L-аргінін) на мейотичне дозрівання ооцитів мишей *in vitro*.

МЕТОДИКА

У роботі використали ооцити від самиць мишей лінії СВА віком 8 тиж і масою 16 –

20 г на стадії дієструсу естрального циклу. Під ефірним наркозом відбирали яєчники, з яких неферментативно виділяли фолікули, а з фолікулів різних розмірів – ооцити, які промивали, підраховували і піддавали морфологічній оцінці [4]. Морфологічне дослідження ооцитів проводили за допомогою інвертованого мікроскопа при збільшенні 40×15 . Враховували наявність зародкового пухирця (ЗП+), стан перивітелінового простору і цитоплазми, а саме щільність, ступінь гранульованості, наявність ознак фрагментації та дегенерації. Ооцити були розділені на дві групи. До I групи віднесли ооцити задовільної якості: із зародковим пухирцем і рівномірно гранульованою цитоплазмою, до II – низької якості: із зародковим пухирцем, розширеним перивітеліновим простором і з цитоплазмою нерівномірно гранульованою, тобто з ознаками фрагментації/дегенерації. Відібрані як задовільні ооцити культивували у стерильному боксі по 40 штук у камерах з 0,4 мл середовища DME з 15 ммоль/л HEPES і концентрацією кальцію 1,71 ммоль/л при 37°C . Відновлення мейозу ооцитами оцінювали за зруйнуванням зародкового пухирця, завершення мейозу - за формуванням полярного тільця. Нітропрурид натрію, який вивільнює NO у позаклітинне середовище [3, 8] і N^{G} -монометил-L-аргінін, який є інгібітором усіх ізоформ NO-синтаз, додавали в середовище

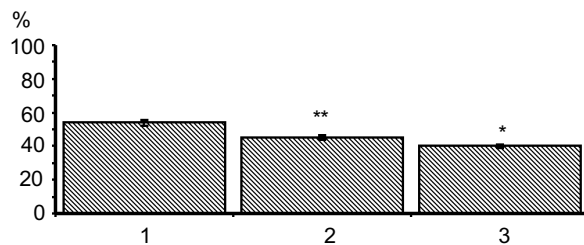


Рис 1. Вплив блокатора NOS на мейотичне дозрівання ооцитів мишей *in vitro*: 1 – ооцити, які формували полярне тільце (%ПТ) у середовищі без блокатора NOS (контроль), 2, 3 – ооцити, які формували полярне тільце (%ПТ) у середовищі з N^{G} -монометил-L-аргініном: 0,02 і 0,12 ммоль/л відповідно.

* $P < 0,01$; ** $P < 0,05$ – достовірність відмінностей відносно контролю.

культивування ооцитів у кінцевих концентраціях, що становили для нітропрусиду натрію 0,12 і 0,20 ммоль/л; для N^{G} -монометил-L-аргінін – 0,02, 0,12 ммоль/л. Обчислювали відношення кількості ооцитів зі зруйнованим зародковим пухирцем (ЗП-) після 1 і 2 год культивування і таких, котрі формували полярне тільце (ПТ) після 20 год культивування до початкової кількості ооцитів із зародковим пухирцем (ЗП+) у відсотках (% ЗП- і %ПТ). Вплив досліджуваних речовин здійснювали паралельно в триплікатах культивованих клітин. У кожному експерименті були контрольні клітини без впливу досліджуваних речовин. Для визначення вірогідності відмінностей між групами використовували критерій *t* Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Раніше встановлено, що після впливу блокаторів NOS відбувається зменшення овуляторної продуктивності та порушення в мейотичному дозріванні ооцитів [1,2,11,18].

Нами показано, що в середовищі з N^{G} -монометил-L-аргінін у дозах 0,02 і 0,12 ммоль/л вірогідно не відбувалося пригнічення відновлення мейозу ооцитами мишей за розчиненням зародкового пухирця, але пригнічувалася здатність ооцитів до завершення мейотичного дозрівання (за формуванням першого полярного тільця)

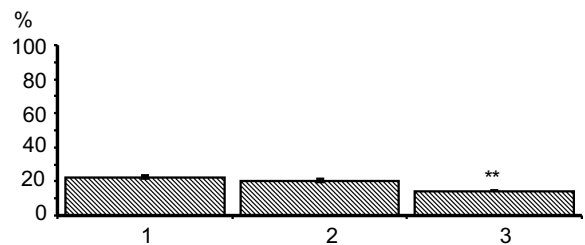


Рис 2. Вплив донора NO на відновлення мейотичного дозрівання ооцитів: 1 – ооцити, які відновлювали мейотичне дозрівання (%ЗП-) у середовищі без донора NO (контроль), 2, 3 – ооцити, які відновлювали мейотичне дозрівання (%ЗП-) у середовищі з нітропруридом натрію: 0,12 і 0,20 ммоль/л відповідно.

** $P < 0,05$ – достовірність відмінностей відносно контролю.

(рис.1). Так, відсоток ооцитів, котрі завершували мейотичне дозрівання становив $45,0 \pm 1,3$ ($P < 0,05$) і $40,0 \% \pm 1,4 \%$ ($P < 0,01$) відповідно порівняно з $54,0 \% \pm 2,5 \%$ у контролі. Таким чином, активність ооцитарних NOS є необхідною умовою для завершення мейотичного дозрівання ооцитів миші. Для уточнення яка (чи які) саме з відомих NOS беруть участь у цих процесах необхідно продовжити дослідження з використанням специфічних (до окремих NOS) блокаторів.

Згідно з даними інших авторів введення нітропрусида натрію викликало фолікулярний розрив при відсутності гонадотропінів, але не впливало на мейотичне дозрівання ооцитів у перфузованих яєчниках самиць кролів [18].

У середовищі з нітропрусидом натрію у концентрації $0,20$ ммоль/л відбувалося пригнічення дозрівання ооцитів на стадії відновлення мейозу (рис.2). Відсоток ооцитів, котрі відновлювали мейотичне дозрівання становив $14,5 \% \pm 1,1 \%$ ($P < 0,05$) порівняно з $22,5 \% \pm 2,5 \%$ у контролі. Отже, певна концентрація NO інгібує оогенез на рівні відновлення мейозу ооцитами.

Таким чином, показано, що активність ооцитарних NOS і наявність NO є необхідною умовою для здійснення мейотичного дозрівання ооцитів, але надлишок NO може бути фактором пригнічення мейозу вже на стадії його відновлення.

T.Yu. Voznesenska, T.V.Blashkiv

THE ROLE OF NITRIC OXIDE IN MEIOTIC MATURATION OF THE MURINE OOCYTES IN VITRO

The preimplantation period is known to be critical for the normal murine development. Although the importance of nitric oxide during gestation was demonstrated, its role in the meiotic maturation of oocytes has not been defined yet. Effects of NO donor SNP and an inhibitor of nitric oxide synthase (NOS) L-NMMA on the meiotic maturation of the murine oocytes were studied in experiments in vitro. The results have shown that an activity of NOS in an oocyte was necessary for meiotic maturation; NO influenced the process of resumption of the oocyte maturation. Those results

evidence that NO is a key modulator of the oocyte meiotic maturation in vitro.

A.A. Bogomoletz Institute of Physiolog

National Academy of Science of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Блашків Т.В., Вознесенская Т.Ю., Корнейчук А.Н., Портниченко А.Г. Роль оксида азота в овуляции, мейотическом созревании ооцитов и имплантации у мышей//Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2001. – **132**, №5. – С.1034 – 1036.
2. Вознесенская Т.Ю., Корнейчук А.Н., Блашків Т.В., и др. Особенности проявления токсических эффектов блокаторов кальциевых каналов и NO-синтаз при моделировании аутоиммунного повреждения яичников у мышей//Совр. пробл.токсикологии. – 2000. – №5. – С.62 – 66.
3. Зима А.В. Механізми дії оксиду азоту на кальцієві і натрієві канали мембран клітин гладких м'язів: Автореф. дис. канд. біол. наук. – К., 1996. – 22 с.
4. Манк А. Биология развития млекопитающих. Методы. – М.: Мир., 1990. – 31 с.
5. Уразаев А.Х., Зефирова А.Л. Физиологическая роль оксида азота//Усп. физиол. наук. – 1999. – **30**, № 1. – С.54 – 72.
6. Anteby E., Hurwitz A., Korach O. et al. Human follicular nitric oxide pathway: relationship to follicular size, oestradiol concentrations and ovarian blood flow//Hum. Reprod. – 1996. – №11. – P. 1947 – 1951.
7. Bonello N., McKie K., Jasper M. et al. Inhibition of nitric oxide: effects of interleukin – 1b -enhanced ovulation rate, steroid hormones, and ovarian leukocyte distribution at ovulation in the rat//Biol. Reprod. – 1996. – **54**. – P.436 – 445.
8. Clap L., Gurney A. Modulation of calcium movements by nitroprusside in isolated vascular smooth muscle cell//Pflug Arch. – 1991. – **418**, № 5. – P.462 – 470.
9. Jablonka-Shariff A., Basuray R., Olson L. Inhibitors of nitric oxide synthase influence oocyte maturation in rats//J. Soc. Gynecol. Investig. – 1999. – **6**, №2. – P. 95 – 101.
10. Jablonka-Shariff A., Olson L. The role of nitric oxide in oocyte meiotic maturation and ovulation: meiotic abnormalities of endothelial nitric oxide synthase knock-out mouse oocytes//Endocrinology. – 1998. – **139**, № 6. – P.2944 – 2954.
11. Jablonka-Shariff A., Olson L. Nitric oxide is essential for optimal meiotic maturation of murine cumulus-oocyte complexes in vitro//Mol. Reprod. Dev. – 2000. – **55**, № 4. – P.412 – 421.
12. Nakamura Y., Kashida Sh., Nakata M. et al. Changes in nitric oxide synthase activity in the ovary of gonadotropin treated rats: the role of nitric oxide during ovulation//Endocrine J. – 1999. – **46**, № 4. – P. 529 – 538.

13. Nathan C., Xie Q. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls//Cell. – 1994. – **78**. – P.915 – 918.
14. Rosselli M. Nitric oxide and reproduction//Mol. Human Reprod. – 1997. – **3**, №8. – P. 639 – 641.
15. Sengoku K., Takuma N., Horikawa M., et al. Requirement of nitric oxide for murine oocyte maturation, embryo development, and trophoblast outgrowth in vitro//Mol. Reprod. Dev. – 2001. – **58**, №3. – P.262 – 268.
16. Van Nassauw L., Tao L., Harrisson F. Localization of nitric oxide-related substances in quail ovary during folliculogenesis//Histochem. J. – 1999. – **31**, №7. – P. 443 – 454.
17. Wood P., Choksi S., Bocchini V. Inducible microglial nitric oxide synthase: a large membrane pool//Neuro. Report. – 1994. – **5**. – P.977 – 980.
18. Yamauchi J., Miyazaki T., Iwasaki S., et al. Effects of nitric oxide on ovulation and ovarian steroidogenesis and prosaglandin production in the rabbit//Endocrinology. – 1997. – **138**. – P.3630 – 3637.

*Ін-т фізіології ім.О.О.Богомольця НАНУкрainи,
Київ*

*Матеріал надійшов
до редакції 29.10.2002*