

ФАРМАКОЛОГИЯ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ

ВЛИЯНИЕ БЛОКАТОРА NO-СИНТАЗ, ДОНОРА NO И ЭКЗОГЕННЫХ ПРОСТАГЛАНДИНОВ E₂ И F_{2α} НА ООЦИТЫ У МЫШЕЙ

Т. Ю. Вознесенская, Т. В. Блашків¹

Исследовали влияние блокатора NO-синтаз (L-NMMA), донора NO [нитропруссид натрия (НП)] и экзогенных простагландинов (ПГ) F_{2α} и E₂ на мейотическое созревание (МС) ооцитов мышей. Экзогенные простагландины E₂ и F_{2α} в дозе 3 мкг/кг оказывают угнетающее влияние на МС ооцитов. Нами впервые получены данные о эффекте L-NMMA на способность к МС ооцитов в зависимости от размера фолликула, из которого они были выделены. Максимальное угнетение МС происходит у ооцитов из малых фолликулов. Введение НП вызвало увеличение количества ооцитов, формирующих полярное тельце из малых и средних фолликулов после 20 ч культивирования. Введение ПГ F_{2α} экспериментальным животным после того как им вводили L-NMMA, дополнительно угнетает МС. Донор NO вызывает уменьшение угнетающего влияния ПГ F_{2α} на МС ооцитов из малых и средних фолликулов. Полученные данные подтверждают участие NO/NOS системы яичника как в эффекте ПГ на мейотическое созревание ооцитов мышей, так и вероятно в механизме действия самих ПГ.

Ключевые слова: окись азота, простагландины, мейотическое созревание, ооциты

ВВЕДЕНИЕ

Простагландины (ПГ) — липидные медиаторы, производные циклооксигеназного метаболизма полиненасыщенных жирных кислот регулируют рост клетки, дифференциацию и гомеостаз [3]. Простагландиновые рецепторы идентифицированы на поверхности клеток. Показано, что ПГ₁ специфично связывает и активирует пролиферативный рецептор, входящий в семейство ядерных гормональных рецепторов [5, 10]. Механизм действия ПГ сложный и не совсем ясный. Циклооксигеназа, катализирующая преобразование арахидоновой кислоты в ПГ, и NO-синтаза, превращающая L-аргинин в NO, существуют в двух изоформах. Конститутивные изоформы обоих ферментов (сyclooxygenase-1 и cNOS) имеют регуляторно-физиологическую роль, тогда как индуцибельные изоформы (сyclooxygenase-2 и iNO) принимают участие в воспалительном процессе [13]. ПГ влияют на процессы овуляции, стероидогенез в яичниках, имплантацию, беременность и роды. Показано, что ПГ серии E модулируют функцию спермия в момент оплодотворения [14]. ПГ E₂ кооперируется с гонадотропином для обеспечения экспансии кумулюсных клеток и успешного оплодотворения [6]. Влияние экзогенных ПГ на ооциты изучено не достаточно. Оценивали секрецию кумулюсно-ооцитарными комплексами (КОКК) крыс ПГЕ в присутствии доноров NO, блокаторов NOS и hCG [8] и при моделировании диабета [9]. На модели псевдобе-

ременных самок крыс изучена роль овариального NO в продукции ПГЕ и ПГF_{2α} в регрессии желтого тела (corpus luteum) [11]. Для определения связи между продукцией овариальной NO и синтезом простагландинов, которые принимают участие в фолликулярном разрыве, исследовали активность NO-синтаз в процессе овуляции у крыс [4]. Роль NO/NOS системы яичника в действии экзогенных ПГ на мейотическое созревание ооцитов не установлена.

Цель работы — исследование влияния блокатора NO-синтаз [N^G-мометил-L-аргинин (L-NMMA)], донора NO [нитропруссид натрия (НП)] и экзогенных простагландинов E₂ и F_{2α} на мейотическое созревание ооцитов мышей.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводили на 10 самках мышей линии СВА на стадии диэструс эстрального цикла массой 16 – 20 г. Блокатор NO-синтаз (L-NMMA) (“Sigma”, США), который угнетает все изоформы NOS, вводили однократно внутривентрально в дозе 3,50 мг/кг, которая была подобрана по данным литературы [12] и установлена экспериментально (0,7; 1,25; 2,5 и 3,5 мг/кг). Донор NO (НП) (“Sigma”, США), вводили однократно внутривентрально в дозе 0,50 мг/кг. Используемая доза была подобрана экспериментально (5, 0,5 и 0,05 мг/кг) на самках мышей линии СВА. Простагландины: F_{2α} (энзапрост-Ф, Украина) и E₂ (динопрост, Украина), вводили однократно внутривентрально в дозе 0,30 мг/кг. Дозы были подобраны по данным литературы [11] и экспериментально (3, 0,3, и 0,03 мг/кг).

¹ Отдел иммунологии и цитотоксических сывороток (зав. — И. Н. Алексева) Института физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины, Киев, 01024, ул. Богомольца, 4.

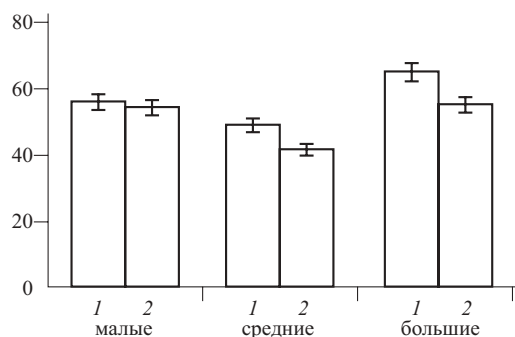


Рис. 1. Влияние простагландина E_2 на способность к мейотическому созреванию ооцитов из фолликулов разных размеров.

По оси абсцисс представлены группы фолликулов: малые, средние, большие, из которых были выделены ооциты; по оси ординат — количество ооцитов, которые формировали полярное тельце (%ПТ). 1 — контроль; 2 — после введения E_2 .

Проведено две серии экспериментов. В первой серии (исследование влияния ПГ на ооциты у мышей) удаляли яичники у экспериментальных и контрольных животных под эфирным наркозом через 20 ч после введения ПГ. Во второй серии (исследование влияния ПГ на ооциты мышей в условиях угнетения овариальных NOS с использованием неспецифического блокатора и участия NO в действии ПГ) блокатор NOS, донор NO и ПГ вводили в следующей последовательности: 1) блокатор NOS, через 20 ч ПГ; 2) ПГ, через 20 ч донор NO. Контрольным животным вводили физиологический раствор тем же способом и в том же объеме. Из яичников не ферментативно (механически) выделяли фолликулы, которые распределяли по размерам (величине диаметра) на “малые” — 143 – 151, “средние” — 251 – 265 и “большие” — 329 – 337 мкм [2].

Ооциты промывали, подсчитывали и проводили их морфологическую оценку. Учитывали состояние: зародышевого пузырька; перивителинового пространства; и цитоплазмы, а именно плотность (1), степень гранулированности (2), признаки фрагментации и деградации (3). Ооциты были разделены на две группы: удовлетворительного качества, а именно: с зародышевым пузырьком и с равномерно гранулированной цитоплазмой; ооциты низкого качества (атипичные), а именно: с увеличенным перивителиновым пространством; с цитоплазмой неравномерно гранулированной, с признаками фрагментации или деградации. Морфологическое исследование ооцитов проводили под микроскопом МБС-10. Ооциты удовлетворительного качества культивировали в камерах с 0,4 мл среды DME с 15 ммоль/л NEPES и концентрацией кальция 1,71 ммоль/л при 37 °C, в стерильном боксе.

Мейотическое созревание ооцитов определяли после морфологической оценки клеток таким образом: метафаза I — наличие зародышевого пузырька (ЗП+); возобновление первого деления мейоза ооцитов — по факту отсутствия зародышевого пузырька (ЗП-); метафаза II — мейотическое созревание ооцитов, по сфор-

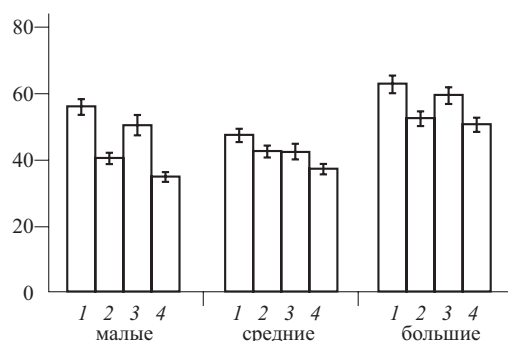


Рис. 2. Влияние блокатора NOS и простагландина (ПГ) $F_{2\alpha}$ на способность к мейотическому созреванию ооцитов из фолликулов разных размеров.

По оси абсцисс представлены группы фолликулов: малые, средние, большие, из которых были выделены ооциты; по оси ординат — количество ооцитов, которые формировали полярное тельце (%ПТ). 1 — контроль; 2 — после введения L-NMMA; 3 — после введения ПГ $F_{2\alpha}$; 4 — после введения L-NMMA и ПГ $F_{2\alpha}$.

мированному первому полярному тельцу (ПТ). Определяли количество ооцитов с атипичной морфологией, как отношение количества ооцитов низкого качества к общему числу ооцитов, выраженное в процентах. Вычисляли отношение количества ооцитов с разрушенным зародышевым пузырьком (ЗП-) после 2 ч культивирования и таких, которые формировали полярное тельце (ПТ) после 20 ч культивирования к начальному количеству ооцитов с зародышем пузырьком (ЗП+) в процентах (%ЗП и %ПТ).

Для определения вероятности отличий между группами данных использовали *t*-критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Экзогенные ПГ E_2 и $F_{2\alpha}$ в дозе 3 мкг/кг угнетающе влияли на ооциты мышей. Так, через 20 ч после введения ПГ количество ооцитов в яичнике достоверно не изменяется, увеличивается процент ооцитов с атипичной морфологией до 8,9 и 7,1 % соответственно, при 3,8 % у контрольных животных. Среди характерных изменений установлено наличие признаков фрагментации цитоплазмы ооцитов.

Синтетические ПГ (E_2 и $F_{2\alpha}$) угнетают способность ооцитов к мейотическому созреванию (МС). После введения ПГ E_2 количество ооцитов из средних и больших фолликулов, которые формировали полярное тельце после 20 ч культивирования составляла $40,2 \pm 0,8$ ($p < 0,01$) и $52,5 \pm 1,4$ % ($p < 0,01$) соответственно, при $47,5 \pm 1,1$ и $62,7 \pm 1,8$ % у контрольных животных (рис. 1). ПГ $F_{2\alpha}$ угнетает способность к МС ооцитов, выделенных из малых и средних фолликулов, соответственно на $50,5 \pm 0,7$ ($p < 0,05$) и $42,5 \pm 1,3$ % ($p < 0,05$) при $55,2 \pm 1,4$ и $47,5 \pm 1,1$ % у контрольных животных (рис. 1).

L-NMMA в дозе 3,50 мг/кг вызвал: уменьшение количества ооцитов, которые выделяются из одного яичника $12,8 \pm 1,4$ шт./яичн. ($p < 0,05$), при $15,6 \pm 0,6$

шт./яичн. в контроле; уменьшение количества ооцитов, способных к завершению МС *in vitro* до $26,1 \pm 1,2$ % ($p < 0,01$) при $50,4 \pm 0,8$ % в контроле; увеличение количества овариальных ооцитов с атипичной морфологией до 14,7 % при 3,3 %.

Блокатор NOS влияет на способность ооцитов к МС в зависимости от размера фолликула, а именно L-NMMA угнетает способность к МС ооцитов из фолликулов всех исследуемых групп: ооцитов из малых на $40,5 \pm 1,3$ % ($p < 0,01$) при $55,2 \pm 0,8$ % в контроле, средних на $42,5 \pm 1,3$ % ($p < 0,05$) при $47,5 \pm 1,1$ % в контроле и больших на $52,5 \pm 1,7$ % ($p < 0,01$) при $62,7 \pm 1,8$ % в контроле. Максимальное угнетение МС происходит у ооцитов из малых фолликулов (рис. 2). После введения ПГF_{2α} экспериментальным животным, которым предварительно был введен блокатор NOS, регистрируется усиление угнетающего влияния L-NMMA на ооциты мышей. Процент ооцитов, которые формируют полярное тельце составляет: из малых фолликулов $35,0 \pm 1,2$ % ($p < 0,01$) при $55,2 \pm 0,8$ % в контроле и $40,5 \pm 1,3$ % тех, которые подвергались влиянию только блокатора NOS; из средних фолликулов $37,2 \pm 1,4$ % ($p < 0,05$) при $47,5 \pm 1,1$ и $42,5 \pm 1,3$ %, соответственно; из больших фолликулов $50,4 \pm 1,3$ % при $62,7 \pm 1,8$ и $52,5 \pm 1,7$ % (рис. 2).

НП при введении самкам мышей на стадии диэструса не вызвало достоверных изменений как в количестве ооцитов, которые выделялись с одного яичника соответственно, $17,0 \pm 1,0$ и $18,1 \pm 0,8$ шт./яичн. при $15,6 \pm 0,6$ шт./яичн. в контроле, так и в способности к возобновлению мейоза ооцитами *in vitro* (ВМ) соответственно на $40,4 \pm 1,3$ и $42,5 \pm 1,4$ % при $38,2 \pm 2,1$ % в контроле. Однако НП вызывал увеличение количества ооцитов, формировавших полярное тельце, соответственно на $55,0 \pm 1,1$ % ($p < 0,05$) и $57,2 \pm 1,4$ % ($p < 0,01$) при $50,4 \pm 0,8$ % в контроле. НП при введении экспериментальным животным, которым до этого вводили ПГF_{2α} вызвал увеличение способности к ВМ ооцитами из малых фолликулов на $57,5 \pm 1,4$ % ($p < 0,05$) при $55,2 \pm 0,8$ % в контроле и на $60,5 \pm 0,7$ % от животных, которые подвергались влиянию только донора NO; и средних на $47,5 \pm 1,3$ % ($p < 0,05$) при $47,5 \pm 1,1$ и $55,2 \pm 1,4$ % соответственно (рис. 3).

Полученные данные о способности ПГ влиять на овуляторную производительность, то есть количество гамет, способных быть оплодотворенными, согласуются с результатами других авторов, установивших, что ПГЕ₂ или ПГF_{2α} при введении крысам на протяжении нескольких дней приводят к уменьшению числа имплантированных оплодотворенных яйцеклеток [1]. Установлена корреляция между овуляторной производительностью и продукцией ПГ перфузированных яичников кролей [15].

Полученные нами данные о способности блокатора NOS влиять на МС ооцитов в зависимости от размера

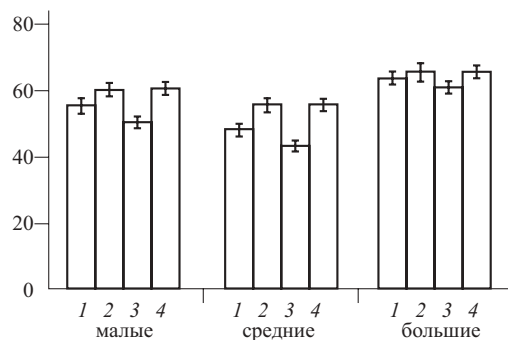


Рис. 3. Влияние простагландина (ПГ) F_{2α} и донора NO на способность к мейотическому созреванию ооцитов из фолликулов разных размеров.

По оси абсцисс представлены группы фолликулов: малые, средние, большие, из которых были выделены ооциты; по оси ординат — количество ооцитов, которые формировали полярное тельце (%ПТ). 1 — контроль; 2 — после введения НП; 3 — после введения простагландина F_{2α}; 4 — после введения простагландина F_{2α} и НП.

фолликула расширяют представления о том, что угнетение NOS/NO с помощью фармакологических веществ повреждает мейотическое созревание ооцитов [7, 12]. Установлена фрагментация цитоплазмы ооцитов, что характерно для последовательного введения фармакологических препаратов: блокатор NOS и ПГ. Данные по изучению мейотического созревания ооцитов мышей, которым вводили блокатор NOS показывают, что меньшее количество ооцитов достигает метафазы II, а большее количество ооцитов задерживается в метафазе I и морфологически видоизменяются. Многие ооциты гибнут, возможно посредством апоптоза. В литературе описаны морфологические характеристики атипичных ооцитов от eNOS-дефицитных мышей: атипично большое первое полярное тельце как следствие повреждения метафазного веретена; наличие двух полярных телец, образующиеся как деление первого полярного тельца или же как от незрелого выделения второго полярного тельца [7]. Полученные данные отличаются от результатов других авторов в том, что в результате введения ПГF_{2α} у псевдобеременных самок крыс отмечается увеличение активности овариальной NOS [11]. Интересно, что *in vivo* продукция овариальных ПГЕ₂ и ПГF_{2α} угнетается введением блокаторов NOS (L-NAME, L-NMMA) [4].

Наши результаты о влиянии донора NO на способность овариальных ооцитов к мейотическому созреванию не согласуются с данными литературы о том, что НП не влияет на мейотическое созревание ооцитов в перфузированных яичниках кроликов, но вызывает фолликулярный разрыв при отсутствии гонадотропинов [15].

Таким образом, донор NO вызывает уменьшение угнетающего влияния ПГF_{2α}, что подтверждает возможность участия NO как в эффекте ПГ на ооциты мышей так и в механизме действия ПГ. Следовательно, ПГF_{2α} может действовать через негеномную сти-

муляцию мембрана / внутриклеточные медиаторы, где медиатором выступает NO.

ВЫВОД

Экзогенные ПГЕ₂ и F_{2α} угнетают мейотическое созревание ооцитов; овариальные NOS включаются в процесс мейотического созревания ооцитов; ПГF_{2α} — усиливает угнетающее влияние блокатора NOS, а НП устраняет влияние ПГF_{2α} на мейотическое созревание ооцитов из малых фолликулов. Это дает основания утверждать, что NO/NOS система яичника принимает участие как в эффекте ПГ на мейотическое созревание ооцитов мышей, так и в механизме действия самих ПГ.

Работа выполнена как часть раздела “Исследование роли эйкозаноидов и оксида азота в гаплоидном формировании половых клеток, а также генетически программируемой гибели соматических клеток млекопитающих” за 2002 год при поддержке целевой академической программы “Молекулярные основы функционирования генома”.

ЛИТЕРАТУРА

1. И. С. Ажгихин, *Простагландины*, Медицина, Москва (1978).
2. Т. В. Блашкив, *Автореф. дис. канд. биол. наук*, Киев (2000).
3. I. Dussault, M. Barry, and A. Forman, *Prostagland. Other Lipid Mediat.*, **62**, 1 – 13 (2000).
4. A. Faletti, S. Martinez, C. Perotti, and de M. Gimeno, *Nitric Oxide: Biol. Chem.*, **3**(4), 340 – 347 (1999).
5. B. Forman, P. Tontonoz, J. Chen, et al., *Cell*, **83**, 803 – 812 (1995).
6. H. Hizaki, E. Segi, Y. Sugimoto, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**(18), 10501 – 10506 (1999).
7. A. Jablonka-Shariff and L. Olson, *Endocrinology*, **139**(6), 2944 – 2954 (1998).
8. A. Jawerbaum, E. Gonzalez, A. Faletti, et al., *Reprod. Fertil. Dev.*, **9**(4), 391 – 394 (1997).
9. A. Jawerbaum, E. Gonzalez, V. Novaro, et al., *Reprod. Fertil. Dev.*, **10**(2), 185 – 190 (1998).
10. S. Kliewer, J. Lenhard, T. Willson, et al., *Cell*, **83**, 813 – 819 (1995).
11. A. Motta, A. Estevez, and M. de Gimeno, *Mol. Hum. Reprod.*, **5**(11), 1011 – 1016 (1999).
12. Y. Nakamura, S. Kashida, M. Nakata, et al., *Endocrin. J.*, **46**(4), 529 – 538 (1999).
13. L. Sautebin, *Fitoterapia*, **71**(1), S48 – S57 (2000).
14. J. Viggiano, M. Herrero, E. Cebral, et al., *Prostagland. Leuk. Essent. Fat. Acids*, **53**(4), 261 – 265 (1995).
15. J. Yamauchi, T. Miyazaki, S. Iwasaki, et al., *Endocrinology*, **138**, 3630 – 3637 (1997).

Поступила 09.01.03

THE EFFECTS OF NO SYNTHASE BLOCKER, NO DONOR, AND EXOGENOUS PROSTAGLANDINS E₂ AND F_{2α} ON MURINE OOCYTES

T. Yu. Voznesenskaya and T. V. Blashkiv

Immunology and Cytotoxic Sera Department, Bogomolets Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, ul. Bogomol'tsa 4, Kiev, Ukraine

The effects of nitric oxide (NO) synthase (NOS) blocker (L-NMMA), NO donor (sodium nitroprusside, Na-NP), and exogenous prostaglandins (PGs) F_{2α} and E₂ on the meiotic maturation (MM) of murine oocytes were studied. The exogenous PGs in a dose of 3.00 μg/kg inhibited the MM of oocytes. The effect of L-NMMA on the MM of oocytes was studied for the first time depending on the size of a follicle from which they were isolated. The maximum inhibition was observed for oocytes isolated from small follicles. Na-NP induced an increase in the number of oocytes from small and medium follicles, capable of forming polar bodies after a 20-h cultivation. The introduction of PG F_{2α} to the test animals pretreated with L-NMMA potentiated the inhibition of MM. The NO donor decreased the inhibiting effect of PG F_{2α} on the MM of oocytes isolated from small and medium follicles. The results confirm that NO/NOS ovarian system is involved into the mechanism of the PG action on the MM of murine oocytes and, probably, in the general mechanism of PG activity.