

ФАРМАКОЛОГИЯ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ

ВЛИЯНИЕ БЛОКАТОРОВ NO-СИНТАЗ, ДОНОРОВ NO И АНТИОВАРИАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ НА ООЦИТЫ МЫШЕЙ

Т. Ю. Вознесенская, Т. В. Блашків¹

Исследовано влияние блокаторов NO-синтаз (NOS), доноров NO и антиовариальных антител (АОАТ) на количество ооцитов выделяемых из яичников мышей и их мейотическое созревание. Установлено, что блокаторы NOS угнетают мейотическое созревание ооцитов. Доноры NO не вызывают достоверных изменений этих параметров. Влияние АОАТ на гаметогенез было угнетающим или стимулирующим, в зависимости от дозы. NO/NOS система яичника участвует в механизмах действия антиовариальных антител на ооциты мышей.

Ключевые слова: оксид азота, антиовариальные антитела, мейотическое созревание ооцитов

ВВЕДЕНИЕ

Оксид азота (NO) обладает широким спектром биологического действия. Образование NO в организме человека и животных происходит при ферментативном окислении L-аргинина при участии семейства цитохром P-450-подобных гемопротеинов — NO-синтаз (NOS). По характеру индукции и действия ферменты разделяются на два вида: 1) кальций-независимая, индуцибельно экспрессируемая цитокинами NO-синтаза (II тип); 2) постоянно присутствующие в клетках тканей кальций- и кальмодулинзависимые ферменты — конститутивные NO-синтазы. Их делят в свою очередь, на нейрональную (I тип) и эндотелиальную (III тип). Биохимически и иммуногистохимически доказано присутствие I, II и III типов NOS в женских репродуктивных органах [3, 10, 14]. Экспериментальные данные подтверждают наличие интраовариальной NO/NOS системы [11, 14]. Однако роль NO в мейотическом созревании ооцитов млекопитающих изучена недостаточно [2, 5, 8]. Известно, что при ряде повреждений в женской репродуктивной системе (воспалительный процесс [9], развитии преждевременной недостаточности яичников [12], повреждении тканей яичников после повторных пункций фолликулов с целью экстракорпорального оплодотворения [6]) в сыворотке крови выявлены антиовариальные антитела (АОАТ). Они регистрируются в случае преждевременной менопаузы, а также при бесплодии [7]. Механизм действия таких антител изучен недостаточно. Нет данных и относительно участия NO или NO-синтазной системы яичника в действии АОАТ на ооциты млекопитающих. Целью этого исследования является изучение влияния

блокаторов NO-синтаз, доноров NO и АОАТ на количество ооцитов в яичнике мыши и на процесс их мейотического созревания.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводили с использованием 10-мочек мышей линии СВА в возрасте 8 недель массой 16 – 20 г. Для всех опытов отбирали самок на стадии диэструса эстрального цикла. Используемые дозы блокаторов NOS: N^G -нитро-L-аргинина метиловый эфир (L-NAME) и N^G -монометил-L-аргинин (L-NMMA), которые угнетают все изоформы NOS подобраны по данным литературы [8] и экспериментально (0,7; 1,25; 2,5; 3,5 мг/кг). Дозы доноров NO-нитропруссид натрия (НП, “Sigma”, США) и S-нитрозо-N-ацетил-пеницилламин (АП, “Sigma”, США), были подобраны по данным литературы [2] и экспериментально (5,0 мг/кг; 0,5 мг/кг). Антиовариальную цитотоксическую сыворотку (АОЦ) получали в результате трехкратной иммунизации кролей антигеном (солевым экстрактом ткани яичника самок мышей) в возрастающих дозах. Титр антител в цитотоксических сыворотках определяли реакцией связывания комплемента и он составил: 1:320. Антиовариальные антитела (АОАТ — как суммарная гаммаглобулиновая фракция антиовариальной цитотоксической сыворотки) выделяли из АОЦ высаливанием серноокислым аммонием. Для моделирования эффектов АОАТ в эксперименте используют ксеногенные антитела, которые по своей природе не отличаются от аутоантител. Используемые дозы АОАТ: 0,2; 0,02; 0,0002 мг/белка. Проведено три серии экспериментов. Животным первой серии через 72 ч после инъекции АОАТ в дозе 0,02 мг однократно внутривентриально вводили L-NAME и L-NMMA в дозах: 1,25 и 2,5 мг/кг соответственно. Животным второй серии через 72 ч после инъекции АОАТ в дозе 0,02 мг однократ-

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

Влияние блокаторов NOS, доноров NO и АОАТ на ооциты мышей ($M \pm m$, $n = 10$)

Группа животных	Доза	Количество ооцитов:		
		в яичнике	% ЗП-	% ПТ
NaCl 0,9 %	0,3 мл	15,6 ± 0,2	38,2 ± 2,1	50,4 ± 0,8
АОАТ	0,02 мг	11,8 ± 0,5 [#]	14,8 ± 0,9 [#]	21,9 ± 0,9 [#]
L-NAME	1,25 мг/кг	14,0 ± 1,4	21,8 ± 1,4 [#]	32,0 ± 1,4 [#]
АОАТ + L-NAME	0,02 мг + 1,25 мг/кг	10,2 ± 1,1	12,8 ± 1,1	17,0 ± 1,4 [#]
L-NMMA	2,5 мг/кг	14,3 ± 1,1	22,5 ± 1,7 [#]	30,0 ± 1,7 [#]
АОАТ + L-NMMA	0,02 мг + 2,5 мг/кг	11,0 ± 1,7	12,5 ± 1,0*	17,0 ± 1,2 [#]
НП	0,5 мг/кг	17,0 ± 1,0	40,4 ± 1,3	55,0 ± 1,1
АОАТ + НП	0,02 мг + 0,5 мг/кг	13,2 ± 1,3	17,5 ± 1,2	22,5 ± 1,3
АП	0,5 мг/кг	18,1 ± 0,8	42,5 ± 1,4	57,2 ± 1,4
АОАТ + АП	0,02 мг + 0,5 мг/кг	14,0 ± 1,1	19,4 ± 0,8	24,8 ± 0,7
АОАТ	0,0002 мг	19,3 ± 1,5**	43,8 ± 0,4	60,8 ± 0,9*
L-NAME	0,7 мг/кг	15,2 ± 0,7	32,0 ± 1,2*	40,0 ± 2,0 [#]
АОАТ + L-NAME	0,0002 мг + 0,7 мг/кг	19,0 ± 0,8	37,5 ± 1,8	46,7 ± 1,4
L-NAME	3,5 мг/кг	12,0 ± 1,0 [#]	17,5 ± 1,2 [#]	22,4 ± 1,3 [#]
АОАТ + L-NAME	0,0002 мг + 3,5 мг/кг	14,0 ± 1,4	20,0 ± 1,2	27,5 ± 1,8

Примечание. АОАТ — антиовариальные антитела; L-NAME — N^G -нитро-L-аргинин метиловый эфир; L-NMMA — N^G -мометил-L-аргинин; НП-нитропруссид натрия; АП-S-нитрозо-N-ацетил-пенициламин; ЗП — ооциты с разрушенным зародышевым пузырьком, которые возобновляли мейоз после 2 ч культивирования; ПТ — ооциты, которые формировали полярное тельце после 20 ч культивирования; * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,02$; # — $p < 0,01$ — вероятность отличий групп данных относительно показателей которым вводили физиологический раствор.

но внутрибрюшинно вводили НП и АП в дозе 0,5 мг/кг. Животным третьей серии через 72 ч после 3-кратного введения (с интервалом в 24 ч) АОАТ в дозе 0,0002 мг белка однократно внутрибрюшинно вводили L-NAME в дозах: 0,7 и 3,5 мг/кг. Контрольным животным вместо блокаторов NOS, доноров NO, препаратов АОАТ вводили физиологический раствор тем же способом и в аналогичном объеме. Извлечение яичников у экспериментальных и контрольных животных осуществляли под эфирным наркозом через 20 ч после последней инъекции. Из яичников выделяли ооциты, которые затем промывали, подсчитывали и проводили их морфологическую оценку. Учитывали состояние зародышевого пузырька, перивителинового пространства, а также цитоплазмы (плотность, степень гранулированности, признаки фрагментации и дегенерации). Ооциты были разделены на две группы: удовлетворительного качества — с зародышевым пузырьком и с равномерно гранулированной цитоплазмой; низкого качества — с зародышевым пузырьком, расширенным перивителиновым пространством; неравномерно гранулированной цитоплазмой с признаками фрагментации или дегенерации. Морфологическое исследование ооцитов проводили под микроскопом МБС-10 при увеличении 12×14 . Изображение получали с помощью инвертированного микроскопа при увеличении 40×15 . Отобранные как удовлетворительные ооциты культивировали в камерах с 0,40 мл среды DME с 15 ммоль/л NEPES и концентрацией кальция 1,71 ммоль/л, при 37°C, в стерильном боксе. Определяли количество ооцитов низкого качества к общему числу ооцитов, выраженное в процен-

тах. Вычисляли также отношение количества ооцитов с разрушенным зародышевым пузырьком (ЗП-), которые возобновляли мейоз (ВМ) после 2 ч культивирования и ооцитов формирующих первое полярное тельце (ПТ) после 20 ч культивирования к начальному количеству ооцитов с зародышевым пузырьком (ЗП+) в процентах (% ЗП- и % ПТ). Для определения вероятности отличий между средними групп данных использовали t -критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Введение АОАТ в дозе 0,02 мг вызывало уменьшение количества ооцитов, которые выделяли из одного яичника ($11,8 \pm 0,5$ шт/яичник ($p < 0,01$), при $15,6 \pm 0,2$ шт/яичник у контрольных животных), которые ВМ ($14,8 \pm 0,9$ % ($p < 0,01$), при $38,2 \pm 2,1$ % в контроле) и формировали полярное тельце ($21,9 \pm 0,9$ % ($p < 0,01$) при $50,4 \pm 0,8$ % в контроле). Трехкратное введение АОАТ в дозе 0,0002 мг вызвало увеличение количества ооцитов, которые выделялись из одного яичника мыши — $19,3 \pm 1,5$ шт/яичник ($p < 0,02$) и которые формировали полярное тельце — $60,8 \pm 0,9$ % ($p < 0,05$) при $52,2 \pm 1,4$ % в контроле), таблица. Таким образом, получены данные об угнетающем влиянии АОАТ в дозе 0,2 мг и стимулирующем трехкратном влиянии АОАТ в дозе 0,0002 мг на возобновление мейоза и формирование полярного тельца ооцитами мышей. Введение мышам L-NAME и L-NMMA в дозах от 0,7 мг/кг до 3,5 мг/кг вызывало уменьшение количества ооцитов, выделяемых из одного яичника мыши, а также ооцитов которые выделя-

ли мейоз и формировали полярное тельце *in vitro* (см. таблицу). Введение НП и АП не вызывало достоверных изменений в количестве ооцитов выделяемых из одного яичника мыши и способности их к мейотическому созреванию.

При введении блокаторов NOS в дозах 1,25 мг/кг (L-NAME) и 2,50 мг/кг (L-NMMA) после введения АОАТ регистрировали усиление угнетения созревания ооцитов *in vitro* ($p < 0,01$, $p < 0,05$), в сравнении с величинами при действии только АОАТ в дозе 0,02 мг белка. В то же время при введении L-NAME в дозах 0,7 мг/кг и 3,5 мг/кг после трехкратного введения АОАТ происходила отмена их стимулирующего действия на ооциты. Введение доноров NO после угнетающей дозы АОАТ не вызывало достоверных изменений в количестве ооцитов в яичнике экспериментальных животных и их способности к мейотическому созреванию *in vitro* относительно таких показателей у контрольных животных. Таким образом, нами получены данные подтверждающие участие NO/NOS системы яичника в механизмах действия антиовариальных антител на ооциты.

Результатами показано, что овариальные NO-синтазы необходимы для обеспечения генеративной функции, а отсутствие NO приводит к угнетению мейотического созревания ооцитов. Такой дефицит продукции NO овариального происхождения и угнетающее влияние антиовариальных антител могут вносить вклад в стерильность самок. Относительно участия на начальных этапах развития аутоиммунного повреждения системы генерации оксида азота и функционально тесно связанных с ней систем циклических нуклеотидов данные литературы противоречивы [4, 13]. Возможно, что это обусловлено высокой активностью оксида азота относительно активных форм кислорода, что предполагает существование нескольких путей метаболизма, где окись азота является промотором или протектором [1].

ВЫВОДЫ

1. Блокаторы NO-синтаз (NOS) угнетают мейотическое созревание ооцитов мышей.
2. Доноры NO не вызывают достоверных изменений в количестве ооцитов, которые выделялись из одного яичника мыши и в их мейотическом созревании.
3. Воздействие антиовариальных антител на гаметогенез было угнетающим или стимулирующим, в зависимости от используемых доз.
4. NO/NOS система яичника участвует в механизмах действия антиовариальных антител на ооциты мышей.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. П. Реутов, Е. Г. Сорокина, В. Е. Охотин, Н. С. КосицынЮ, *Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих*, Наука, Москва (1998).
2. G. Basini, M. Barstta, N. Ponderato, et al., *Reprod. Fertil. Dev.*, **10**(6), 471 – 478 (1998).
3. C. Bryant, A. Tomlinson, J. Mitchell, et al., *J. Endocrinol.*, **146**(1), 149 – 157 (1995).
4. I. T. Cameron and S. Campbell, *Hum. Reprod. Update*, **4**(5), 565 – 569 (1998).
5. A. Jablonka and L. Olson, *Endocrinology*, **139**, 2944 – 2954 (1998).
6. Y. Hovav, M. Almagor, D. Benbenishti., et al., *Hum. Reprod.*, **9**(4), 643 – 645 (1994).
7. J. Luborsky, B. Lianes, S. Davies, et al., *Clinical. Immunology.*, **90**(3), 368 – 374 (1999).
8. Y. Nakamura, S. Kashida, M. Nakata, et al., *J. Endocr.*, **46**(4), 529 – 538 (1999).
9. D. A. Niauru, *Fiziol. Cheloveka*, **21**(3), 166 – 169 (1995).
10. B. Van Voorhis, K. Moore., P. Strijbos, et al., *J. Clin. Invest.*, **96**(6), 2719 – 2726 (1995).
11. L. van Nassauw, L. Tao, and F. Harrisson, *Histochem. J.*, **31**(7), 443 – 454 (1999).
12. N. J. Wheatcroft, A. A. Toogood, T. C. Li, et al., *Clin. Exp. Immunol.*, **96**(1), 122 – 128 (1994).
13. G. Wu, C. J. Meininger, D. A. Knabe, et al., *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, **3**(1), 59 – 66 (2000).
14. U. Zackrisson, M. Mikuni, A. Wallin, et al., *Hum. Reprod.*, **11**(12), 2667 – 2673 (1996).

Поступила 17.07.2001

THE EFFECT OF NITRIC OXIDE SYNTHASE BLOCKERS, NITRIC OXIDE DONORS, AND ANTI-OVARIAN ANTIBODIES ON MURINE OOCYTES

T. Yu. Voznesenskaya and T. V. Blashkiv

Department of Immunology and Cytosera, Bogomolets Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, ul. Bogomoltsa 4, Kiev 01024, Ukraine

The effects of NO synthase (NOS) blockers, NO donors, and anti-ovarian antibodies (AOABs) on the amount of oocytes isolated from murine ovary and their meiotic maturation were studied. It was established that the NOS blockers inhibit the their meiotic maturation of oocytes, while NO donors influenced neither the number of oocytes nor their ability to meiotic maturation in diaestrus or oestrous cycle. The AOAB effect on the gametogenesis was dose-dependent: inhibition for large doses and activation for small doses. The NO/NOS ovarian system is involved into mechanism of the AOAB action on murine oocytes. It is suggested that a decrease in the ovarian NO production, as well as the AOAB-induced inhibition of the murine oogenesis, are factors influencing female infertility.