

ВПЛИВ L-НОРВАЛІНУ НА МЕЙОТИЧНЕ ДОЗРІВАННЯ ООЦИТІВ І ЗАГИБЕЛЬ КУМУЛЮСНИХ КЛІТИН В УМОВАХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ МІТОХОНДРІАЛЬНОЇ ДИСФУНКЦІЇ

Блашків Т.В., Вознесенська Т.Ю., Янчій Р.І.

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ

Блашків Т.В., Вознесенська Т.Ю., Янчій Р.І. Вплив L-норваліну на мейотичне дозрівання ооцитів і загибель кумулюсних клітин в умовах експериментальної мітохондріальної дисфункції // Український морфологічний альманах. – 2012. – Том 10, № 1. – С. 14-15.

У цій роботі нами вперше застосовано блокатор аргінази II (L-норвалін) в культурі кумулюсних клітин і ооцитів мишей. L-норвалін збільшує у ~2,5 разів кількість апоптотичних кумулюсних клітин з великих компактних фолікулів, і в 1,2 разів – ооцитів, що формували полярне тільце з середніх розширених фолікулів. Є підстави стверджувати, що NO може здійснювати екзогенне (з боку кумулюсних клітин) регулювання мейотичного дозрівання ооцитів.

Ключові слова: мітохондріальна дисфункція, ооцити, кумулюсні клітини, L-норвалін.

Блашків Т.В., Вознесенская Т.Ю., Янчий Р.И. Влияние L-норваллина на мейотическое созревание ооцитов и гибель кумулюсных клеток в условиях экспериментальной митохондриальной дисфункции // Украинский морфологический альманах. – 2012. – Том 10, № 1. – С. 14-15.

В работе нами впервые применен блокатор аргиназы II (L-норваллин) в культуре кумулюсных клеток и ооцитов мышей. L-норваллин увеличивает в ~2,5 раза количество апоптотических кумулюсных клеток из больших компактных фолликулов, и в 1,2 раза - ооцитов, сформировавших полярное тельце из средних расширенных фолликулов. Есть основания утверждать, что NO может осуществлять экзогенное (со стороны кумулюсных клеток) регулирование мейотического созревания ооцитов.

Ключевые слова: митохондриальная дисфункция, ооциты, кумулюсные клетки, L-норваллин.

Blashkiv T.V., Voznesenskaja T.Yu., Yanchij R.I. Influence L-norvaline on oocyte meiotic maturing and on cumulus cell destruction in condition of experimental mitochondrial dysfunctions // Украинский морфологический альманах. – 2012. – Том 10, № 1. – С. 14-15.

In this work as us for the first time it is applied arginase II inhibitor (L-norvaline) in culture cumulus cells and mice oocytes. L-norvaline increases in ~2,5 times apoptotic cumulus cell amount from the big compact follicles, and in 1,2 times - amount of oocytes with first polar body from the average expanded follicles. There are bases to approve that NO can carries out (from the side of cumulus cells) regulation of oocyte meiotic maturation.

Key words: mitochondrion dysfunction, oocytes, cumulus cells, L-norvaline.

Материнська передача мітохондрій - генетична основа для успадкування певних метаболічних розладів у людини. Вважають, що структурні відхилення, виявлені в ооцитах і ембріонах, можуть бути, пов'язані з мітохондріальними дисфункціями.

Оксид азоту (NO) є важливим внутрішньо- і міжклітинним регулятором багатьох фізіологічних процесів. Приймаючи до уваги участь NO у функціонуванні яєчника за фізіологічних умов, важливим є з'ясування його ролі в мейотичному дозріванні ооцитів і загибелі кумулюсних клітин в умовах експериментальної мітохондріальної дисфункції.

Метою дослідження було вивчення впливу інгібітора NO за аргіназином шляхом (L-норваліну) на мейотичне дозрівання ооцитів і загибель кумулюсних клітин в умовах експериментальної мітохондріальної дисфункції *in vitro*.

Матеріали і методи. Дослідні проведені на статевозрілих самках мишей лінії СВА масою 18-20 г. З яєчників мишей виділяли фолікули різних розмірів (малі, середні та великі), з яких окремо виділяли ооцити і кумулюсні клітини. За морфологічними ознаками кумулюсного клітинного розширення досліджували фолікули, що належали до категорій компактних і розширених. Інгібітор *in vitro* мейотичне дозрівання ооцитів. Після 4 г культивування підраховували ооцити, що перебували на стадії метафази I - розчинення зародкового пухирця, а після 20 г - на стадії метафази II - формування першого полярного тільця, а також ооцити з атипичною морфологією. Інгібітор аргінази II (L-норвалін (L-Nor)) та інгібітор аспаргатамалатних мітохондріальних переносників (піридоксал 5'-фосфат (pyridoxal 5'-phosphate, PPT) в концентраціях 50 нмоль/л і 30 мкмоль/л, відповідно, додавали в культуральне середовище. Для оцінки живих, апоптотичних та некротичних кумулюсних клітин використовували метод прижиттєвого по-

двійного забарвлення флюоресцентними барвниками: Хехст 33422 та пропідіумом йодидом. Пропідіум йодид проникає тільки у клітини з ушкодженими мембранами і забарвлює їх ядра в оранжевий колір. Барвник Хехст 33342 проникає і через неушкожені мембрани і забарвлює ядра живих клітин в синьо-зелений колір. Зв'язані з хроматином барвники дають змогу оцінити морфологічні риси ядерного матеріалу, притаманні апоптозу: периферичне розташування хроматину, його конденсацію, фрагментацію ядер, а також розпад клітин на апоптотичні тільця. Забарвлення проводили в буференому фосфатом фізіологічному розчині з барвниками в кінцевій концентрації 10 мкмоль/л на протязі 10 хв. Після відмивання клітини ресуспендували, фіксували 5% формаліном та робили мазки. Морфологічні дослідження проводили за допомогою люмінесцентного мікроскопа МЛ-2. Визначали відсоток живих, апоптотичних та некротичних клітин при підрахунку не менш як 200 клітин. Для оцінки вірогідності використовували t-критерій Ст'юдента. При роботі дотримувались Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин.

Результати та їх обговорення. Дані про вплив інгібітора аргінази II та інгібітора аспаргатамалатних мітохондріальних переносників на апоптоз кумулюсних клітин (КК) подані в таблиці 1.

Встановлено, що L-норвалін в умовах дії PPT збільшує кількість апоптотичних КК з великих компактних фолікулів, а сам мітохондріальний переносник в малих компактних фолікулах, мабуть, залежить від (мітохондріальної) NO, а в великих компактних - навпаки.

Дані про вплив L-Nor та PPT на мейотичне дозрівання ооцитів при культивуванні різних груп кумулюсно-ооцитарних клітинних комплексів подано в таблиці 2.

Таблиця 1. Вплив L-норваліну (L-Nor) та PPT на кількість апоптотичних кумулюсних клітин з різних груп фолікулів (у % до загальної кількості клітин).

Фолікули	Контроль	L-Nor	PPT	L-Nor+PPT
малі ком.	34,20±1,27	42,50±5,48	48,80±2,42*	55,81±3,89*
великі ком.	9,10±1,21	22,43±5,31*	11,70±2,54	30,23±5,42* #

*- $p < 0.01$ – відносно контролю; # - $p < 0.01$ – відносно PPT.

Таблиця 2. Кількість ооцитів, що сформували полярне тільце з фолікулів різних розмірів і з різним кумулюсним оточенням

Середні фолікули	Кількість ооцитів, що сформували полярне тільце (%)			
	контроль	L-Nor	PPT	PPT+L-Nor
компактні	44,52±3,41	32,57±5,23	37,73±3,48	30,83±2,43 *
розширені	78,37±2,24	68,36±2,41**	64,51±5,23**	57,5±3,41 *

*- $p < 0.01$; **- $p < 0.05$ – відносно контролю.

У цій роботі нами вперше застосовано блокатор аргінази II в культурі кумулюсних клітин і ооцитів мишей *in vitro*. L-Nor збільшує у ~2,5 разів кількість апоптотичних кумулюсних клітин з великих компактних фолікулів, і в 1,2 разів – ооцитів, що формували полярне тільце з середніх розширених фолікулів. Встановлено, що L-Nor в умовах дії PPT зменшує кількість ооцитів з середніх компактних і з середніх розширених фолікулів, що сформували полярне тільце, а сам мітохондріальний переносник в середніх фолікулах, мабуть, не залежить від мітохондріальної NO.

Відомо, що між ооцитом і кумулюсними клітинами здійснюється обмін, свого роду безперервний двохнаправлений потік регуляторних і сигнальних факторів, включаючи такі як цАМФ, що підтримують мейоз у призушеному стані [1]. Виявлення флуоресценції J-сукупності в субплазмолемальній області цитоплазми ооцитів на стадії розчинення зародкового пухирця [10], підтверджує існування прямого обміну між ооцитом і компатентами соматичних клітин в кумулюсно-ооцитарних клітинних комплексах (КОКК), що утримує зсув мембранного потенціалу мітохондрії ($\Delta\Psi_m$) у бік зростання [9]. Таким чином, якщо зростання $\Delta\Psi_m$ в субплазмолемальній області цитоплазми є раннім аспектом прероляторного дозрівання ооцита, то міжклітинний обмін може здійснювати екзогенне регулювання $\Delta\Psi_m$.

Імовірним чинником, залученим у регулювання $\Delta\Psi_m$, називають NO - вільний радикал, що утворюється з L-аргініну до NO і L-цитруліну за допомогою NOS, має низьку молекулярну вагу, коротко живучий і нестабільний [10]. Добре відомо, що NO має час напіврозпаду - секунди й швидко й вільно проходить поперек мембрани [4]. Відомо, що NO може здійснювати вплив на мейотичне дозрівання ооцита через цГМФ, цАМФ і через сигнальні шляхи, наприклад, мітоген-активізованої протеїн кинази [2, 5-8, 11].

Відомо, що перекачування протона спрямоване назовні поперек внутрішньої мітохондріальної мембрани створює протонний градієнт. Це має два компоненти $\Delta\Psi_m$ і градієнт рН, енергія, збережена в будь-якому компоненті веде перетворення АДФ до АТФ ферментами дихального ланцюга. NO має стимулюючі або пригнічуючі ефекти на $\Delta\Psi_m$ залежно від стану метаболізму й локального окислювально-відновного оточення в цитоплазмі, конкурує з киснем на рівні внутрішньої мітохондріальної мембрани і є регуляторним, щодо дихання [3]. Таким чином, властивості NO сумісні з роллю в регулюванні мітохондріальної полярності.

Висновки: З використанням фармакологічних препаратів блокатора аргінази II і малат-дегідрогенази встановлено, що аспаргат-малатні мі-

тохондріальні переносники кумулюсних клітин малих компактних фолікулів є NO залежними, а переносники кумулюсних клітин великих компактних - NO не залежними; мітохондріальні переносники ооцитів середніх фолікулів - NO не залежні.

Є підстави стверджувати, що NO може здійснювати екзогенне, з боку кумулюсних клітин, перекачування протона в регулюванні мейотичного дозрівання ооцитів. NO-опосередковані механізми регуляції мітохондріями ооцито- і фолікулогенезу у мишей вимагає подальших досліджень.

ЛІТЕРАТУРА:

- Albertini D., Barrett S. Oocyte-somatic cell communication // *Reprod. Suppl.* – 2003. – V.61. – P. 49–54.
- Bu S., Xia G., Tao Y., et al. Dual effects of nitric oxide on meiotic maturation of mouse cumulus cell-enclosed oocytes *in vitro* // *Mol. Cell Endocrinol.* – 2003. – V. 207. – P. 21–30.
- Erusalimsky D., Moncada S. Nitric oxide and mitochondrial signaling: from physiology to pathophysiology // *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* – 2007. – V. 27. – P. 2524–2531.
- Gouge R., Marshburn P., Gordon B., et al. Nitric oxide as a regulator of embryonic development // *Biol. Reprod.* – 1998. – V. 58, № 4. – P. 875–879.
- 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. – V. 139, № 6. – P. 2944–1954.
- Lander H., Jascovina A., Davis R., Taurus J. Differential activation of mitogen-activated protein kinase by nitric oxide-related species // *J. Biol. Chem.* – 1996. – V. 271. – P. 19705–19709.
- Nakamura Y., Yamagata Y., Sugino N., et al. Nitric oxide inhibits oocyte meiotic maturation // *Biol. Reprod.* – 2002. – V. 67. – P. 1588–1592.
- 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. – V. 58, № 3. – P. 262–268.
- Van Blerkom J. The role of mitochondria in human oogenesis and preimplantation embryogenesis: engines of metabolism, ionic regulation and developmental competence // *Reproduction.* – 2004. – V. 128. – P. 269–280.
- Van Blerkom J., Davis P., Thalhammer V. Regulation of mitochondrial polarity in mouse and human oocytes: the influence of cumulus derived nitric oxide // *Molecular Human Reproduction.* – 2008. – V.14, № 8. – P. 431–444.
- Viana K., Caldas-Bussiere M., Matta M., et al. Effects of sodium nitroprusside, a nitric oxide donor, on the *in vitro* maturation of bovine oocytes // *Anim. Reprod. Sci.* – 2007. – V. 102. – P. 217–227.

Надійшла 04.12.2011 р.

Рецензент: проф. В.І.Лузін