

РОЛЬ РАЗНЫХ ИЗОФОРМ NO-СИНТАЗЫ В РЕГУЛЯТОРНОМ ВЛИЯНИИ ПРОЛАКТИНА И ГОРМОНА РОСТА НА СОСТОЯНИЕ ХРОСОМ В СОЗРЕВШИХ ООЦИТАХ, СТАРЕЮЩИХ *IN VITRO*

© 2019 г. И. Ю. Лебедева¹, *, Г. Н. Сингина¹, Е. Н. Шедова¹, А. В. Лопухов¹, Н. А. Зиновьева¹

¹Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ им. акад. Л.К. Эрнста, Подольск–Дубровицы, Россия

*E-mail: irledv@mail.ru

Поступила в редакцию 19.07.2018 г.

После доработки 03.08.2018 г.

Принята к публикации 14.08.2018 г.

Фертильность самок млекопитающих зависит от качества ооцитов, которое снижается в процессе биологического старения. Нами обнаружено тормозящее влияние двух родственных гипофизарных гормонов – пролактина (ПРЛ) и гормона роста (ГР) – на деструктивные модификации метафазных хромосом в яйцеклетках домашней коровы (*Bos taurus taurus*), стареющих *in vitro*. В представленной работе было исследовано участие разных изоформ NO-синтазы (NOS) в реализации влияния ПРЛ и ГР на возрастные изменения МП хромосом при пролонгированном культивировании созревших *in vitro* ооцитов коров. В отсутствие гормонов NPLA, ингибитор нейрональной NOS (*n*NOS), не влиял на частоту хромосомных аномалий в стареющих ооцитах. В то же время 1400 W, ингибитор индуцибельной NOS (*i*NOS), и L-NAME, эффективный ингибитор эндотелиальной NOS (*e*NOS) и *n*NOS, снижали эту частоту, тогда как блокирование всех трех изоформ NO-синтазы приводило к обратному эффекту. Тормозящее влияние ПРЛ на деструктивные модификации хромосом в стареющих яйцеклетках возрастало в присутствии L-NAME, но не было выражено при ингибировании *n*NOS, *i*NOS или одновременно всех изоформ NO-синтазы. Ни NPLA, ни L-NAME не модулировали тормозящего влияния ГР на аномальные изменения хромосом в ооцитах. Напротив, блокирование *i*NOS, а также всех трех изоформ NO-синтазы приводило к повышению доли ооцитов с деструктивными изменениями МП хромосом. При этом уровень общей активности NO-синтазы в ооцитах не зависел от присутствия исследуемых гормонов или NOS ингибиторов во время пролонгированного культивирования ооцит-кумулясных комплексов. Полученные данные позволяют предположить, что тормозящее влияние ПРЛ и ГР на аномальные изменения метафазных хромосом в стареющих яйцеклетках коров связано со снижением активности эндотелиальной NO-синтазы, а также (в случае ПРЛ) с повышением активности нейрональной NO-синтазы в клетках кумулюса, окружающих ооциты.

Ключевые слова: старение ооцитов, метафазные хромосомы, пролактин, гормон роста, NO-синтаза, клетки кумулюса

DOI: 10.1134/S0041377119010048

Фертильность самок млекопитающих зависит от множества факторов, в первую очередь от качества ооцитов, которое снижается в процессе биологического старения (Tatone et al., 2008). Различают два основных типа старения половых клеток. Материнское, или репродуктивное, старение протекает медленно (от нескольких лет до нескольких десятков

лет) и затрагивает незрелые ооциты на стадии профаза первого деления мейоза (Broekmans et al., 2009). Постовуляторное старение происходит быстро (от нескольких часов до нескольких десятков часов) и запускается после достижения созревающей яйцеклеткой стадии метафазы II (МП) в отсутствие активирующего стимула к эмбриональному развитию (Miao et al., 2009).

Установлено, что многие морфофункциональные изменения ооцитов в яичниках стареющих самок сходны с таковыми, происходящими при постовуляторном старении яйцеклеток в организме молодых самок, а также при пролонгированном культивировании ооцитов, созревших до стадии МП. К таким изменениям относят предрасположенность к партеногенезу и апоптозу, аномалии хромосом и веретена деления, снижение способности к эмбриональному

Принятые сокращения: ГР – гормон роста, ЛГ – лютеинизирующий гормон, МП – метафаза II, ОКК – ооцит-кумулясные комплексы, ПРЛ – пролактин, усл. ед. – условные единицы, ФБС – фетальная бычья сыворотка, ФСГ – фолликулостимулирующий гормон, *e*NOS – эндотелиальная NOS, *i*NOS – индуцибельная NOS, L-NAME – N(омега)-нитро-L-аргинина метиловый эфир гидрохлорид, L-NIO – N5-(1-иминоэтил)-L-орнитина дигидрохлорид, *n*NOS – нейрональная NOS, NOS – NO-синтаза, NPLA – N-пропил-L-аргинин, 1400W – N-(3-(аминометил)фенил)метилэтанамид дигидрохлорид, β-NADPH – никотинамид-β-аденин динуклеотид фосфат.

развитию, фрагментацию и лизис (Battaglia et al., 1996; Te Velde, Pearson, 2002; Tatone et al., 2006; Miao et al., 2009; Nevala et al., 2013). В основе этих негативных последствий старения лежат процессы, происходящие в цитоплазме ооцитов и связанные в первую очередь с нарушением функции митохондрий и гомеостаза внутриклеточного кальция, эпигенетическими трансформациями и модификацией белкового спектра (Eichenlaub-Ritter et al., 2004; Tatone et al., 2006, 2008; Miao et al., 2009; Takahashi et al., 2009; Liang et al., 2012).

Несмотря на важность проблемы, механизм старения женских гамет, особенно его физиологические регуляторы, исследованы в недостаточной степени. Имеющаяся информация свидетельствует в пользу как свободнорадикальной теории старения, так и модулирующего влияния фолликулярного соматического окружения (Miao et al., 2009; Zhang et al., 2013; Al-Edani et al., 2014). Показано также, что некоторые негативные изменения в стареющих ооцитах ассоциированы с нарушением функционирования сигнальных путей, зависящих от различных протеинкиназ, таких как CDK1, MAP-киназа, протеинкиназы C и Akt (Tian et al., 2002; Tatone et al., 2006; Petr et al., 2011; Cecconi et al., 2014; McGinnis et al., 2014).

В качестве одного из регуляторов возрастных изменений яйцеклеток рассматривается оксид азота (NO) – внутриклеточный химический мессенджер, который синтезируется из L-аргинина с помощью фермента NO-синтаза (NOS) (Miao et al., 2009). Молекула NO функционирует как важный модулятор фолликулогенеза, атрезии, стероидогенеза, овуляции, лютеолиза, а также созревания ооцитов у различных видов (Hattori, Tabata, 2006; Pandey et al., 2010; Basini, Grasselli, 2015). Синтаза NO существует в трех изоформах – эндотелиальной NOS (eNOS), нейрональной NOS (nNOS) и индуцибельной NOS (iNOS). У млекопитающих, в том числе у крупного рогатого скота, в ооцитах и окружающих их соматических клетках кумулюса/гранулезы обнаружены все три изоформы NO-синтазы или их мРНК (Hattori, Tabata, 2006; Pires et al., 2009; Dubey et al., 2012). Разные изоформы NOS могут вносить различный вклад в регуляцию старения ооцитов, что указывает на необходимость дифференцированного исследования роли каждой изоформы.

Согласно современным представлениям о свободнорадикальных механизмах старения, NO может образовывать в клетках реактивные промежуточные продукты, способные вызывать нитрозативное повреждение биологических молекул (Drew, Leeuwenburgh, 2002). Имеющиеся в литературе данные о роли оксида азота в регуляции возрастных изменений яйцеклеток весьма противоречивы. Было продемонстрировано, что содержание NO в ооцитах старых крыс значительно ниже, чем в ооцитах молодых животных (Goud et al., 2014). Напротив, постовулятор-

ное старение яйцеклеток крыс приводило к повышенному образованию оксида азота, сопряженному с усилением экспрессии iNOS (Premkumar, Chaube, 2015). В то же время в стареющих *in vitro* ооцитах свиней было обнаружено снижение иммунореактивности всех трех изоформ NO-синтазы (Nevala et al., 2013). Культивирование женских гамет в присутствии доноров NO и ингибиторов NOS также показало двойственный характер влияния оксида азота на процессы, связанные со старением ооцитов млекопитающих (Goud et al., 2005, 2008; Nevala et al., 2013).

При использовании модели пролонгированного культивирования созревших ооцитов домашней коровы (*Bos taurus taurus*) ранее нами было выявлено усиление деструктивных изменений метафазных хромосом в стареющих яйцеклетках (Лебедева и др., 2014). Кроме того, нами было обнаружено тормозящее влияние двух родственных гипофизарных гормонов – пролактина (ПРЛ) и гормона роста (ГР) – на возрастные модификации хромосом в ооцитах. Это действие опосредовалось клетками кумулюса и достигалось путем активации сигнальных путей, зависящих от тирозинкиназ семейства Src, протеинкиназы B/Akt и протеинкиназы C (Lebedeva et al., 2015). В представленной работе методом ингибиторного анализа было исследовано участие разных изоформ NO-синтазы в реализации влияния ПРЛ и ГР на состояние метафазных хромосом при пролонгированном культивировании созревших *in vitro* ооцитов коров.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Выделение и подготовка ооцитов. Объектом исследования служили ооцит-кумулюсные комплексы (ОКК) из антральных фолликулов яичников коров и половозрелых телок. Полученные на мясокомбинате яичники без видимых признаков патологии доставляли в лабораторию при 30–35°C в течение 3 ч после овариэктомии животных и многократно отмывали в стерильном физиологическом растворе с антибиотиками (100 ед./мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина). Изоляцию и оценку ОКК выполняли, как описано ранее (Лебедева и др., 2009). Клетки промывали в среде ТС-199, содержащей 5% ФБС, 10 мкг/мл гепарина, 0,2 мМ пирувата натрия и 50 мкг/мл гентамицина. Все манипуляции с ооцитами осуществляли под стереомикроскопом Nikon (Япония) на нагревательном столике Tokai Hit (Япония) при 37°C.

Культивирование ооцитов. Морфологически нормальные ОКК культивировали в течение 20 ч в среде ТС-199, содержащей 10% ФБС, 1 мМ пирувата натрия, 10 мкг/мл ФСГ, 10 мкг/мл ЛГ и 50 мкг/мл гентамицина. Затем ОКК переносили в среду старения ТС-199, содержащую 10% сыворотки и 50 мкг/мл гентамицина (контроль), и дополнительно культивировали в течение 24 ч. В среду опытных групп вносили 50 нг/мл ПРЛ или 10 нг/мл ГР и (или) ингибиторы NO-синтазы. Применяли следующие селективные и неселектив-

ные ингибиторы – NPLA (ингибитор *n*NOS, 5 мкМ), 1400W (ингибитор *i*NOS, 1 мкМ), L-NAME (эффективный ингибитор *e*NOS и *n*NOS, 20 мкМ) и L-NIO (неселективный ингибитор *i*NOS, *e*NOS и *n*NOS, 200 мкМ). Через 24 ч пролонгированного культивирования ооциты освобождали от клеток кумулюса путем инкубации ОКК в 0.1%-ном растворе гиалуронидазы (в среде созревания без ФСГ и ЛГ) в течение 1 мин при 37°C и последующего пипетирования комплексов с помощью микропипетки, имеющей диаметр отверстия 130 мкм. Изолированные ооциты использовали для цитогенетического анализа или определения активности NO-синтазы цитохимическим методом.

Цитогенетический анализ. Препараты ядерного материала ооцитов готовили согласно описанной ранее методике (Лебедева и др., 2005). Стадии мейоза определяли в соответствии с известными морфологическими критериями (Нота, 1988). Наличие деструктивных изменений хромосом на стадии МII оценивали, как описано нами ранее, на основании следующих признаков – деконденсация (потеря четких морфологических очертаний, увеличение объема хромосом и неровные морфологические контуры), частичное слипание, образование единой комковатой массы (Лебедева и др., 2014; Lebedeva et al., 2015). Исследование ядерного материала в ооцитах проводили с помощью микроскопа Axio Imager.M2 (Carl Zeiss, Германия) при общем увеличении 1000× (увеличение объектива – 100×).

Анализ активности NO-синтазы. Общую активность NOS в ооцитах определяли на основании активности NADPH диафоразы (Nishikimi et al., 2001). С этой целью яйцеклетки фиксировали 4%-ным раствором параформальдегида в PBS в течение 20 мин при комнатной температуре и пермеабелизировали 0.2%-ным раствором Тритона X-100 в PBS в течение 30 мин. Затем ооциты инкубировали в темноте в 100 мМ Tris-HCl-буфере (pH 7.2), содержащем 0.05% BSA, 0.2% Тритона X-100, 1 мМ β -NADPH и 0.25 мМ нитроголубого тетразолиума, при 37°C в течение 50 мин (до образования фиолетово-синей окраски). В качестве негативного контроля использовали ооциты, инкубируемые без β -NADPH. После инкубации ооциты промывали в растворе PBS и помещали на предметное стекло в каплю смеси глицерина и PBS (1 : 3). Микроскопическое исследование и микрофотографирование препаратов проводили под микроскопом Orpton (Германия) при увеличении объектива 40×. Для полуколичественной оценки общей активности NO-синтазы в ооцитах инверсию цифрового изображения переводили в градацию серого. Интенсивность окрашивания яйцеклеток определяли денситометрически с помощью программного обеспечения ImageScope (Leica Biosystems, Германия). Из полученных значений вычитали интенсивность окрашивания ооцитов в негативном контроле. Данные по уровню активности NO-синтазы выражали в условных единицах (усл. ед.).

Эксперименты по культивированию ОКК были выполнены в 3–4 независимых повторностях. Каждая экспериментальная группа содержала в сумме не менее 70 ооцитов (для цитогенетического анализа) или 20–25 ооцитов (для цитохимического анализа). Данные обрабатывали с использованием методов однофакторного и двухфакторного дисперсионного анализа при помощи программы SigmaStat (Systat Software, Inc., США). Достоверность различия сравниваемых средних значений оценивали с использованием критерия Тьюки, при этом был принят уровень значимости $P < 0.05$.

Использованные реактивы: среда TC-199 (с L-глутамином и NEPES), гентамицин, пируват натрия, свиной фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), овечий лютеинизирующий гормон (ЛГ), гиалуронидаза, BSA, N(омега)-нитро-L-аргинина метиловый эфир гидрохлорид (L-NAME), никотинамид- β -аденин динуклеотид фосфат (β -NADPH), нитроголубой тетразолиум, краситель Гимза (Sigma, США); фетальная бычья сыворотка (ФБС; Nuclone, США); гипофизарный бычий ПРЛ (Эндокринологический научный центр РАН, Москва); N-пропил-L-аргинин (NPLA), N5-(1-иминоэтил)-L-орнитина дигидрохлорид (L-NIO), N-([3-(аминометил)фенил]метил)этанидамида дигидрохлорид (1400W) (Tocris Bioscience, Великобритания).

РЕЗУЛЬТАТЫ

При проведении исследований ПРЛ и ГР были использованы в концентрациях, при которых они оказывали тормозящее влияние на деструктивные изменения хромосом в стареющих ооцитах коров, окруженных клетками кумулюса (Lebedeva et al., 2015). Выбранные концентрации ингибиторов не менее чем в 50–100 раз превышали известные Ki для соответствующих NO-синтаз. Во всех сравниваемых экспериментальных группах выход созревших яйцеклеток (достигших стадии МII) достоверно не различался и варьировал от 74.3 до 87.9%.

Сразу после созревания доля ооцитов с деструктивными изменениями метафазных хромосом составляла $16.8 \pm 2.1\%$. Через 24 ч старения окруженных кумулюсом ооцитов была выявлена высокая частота аномальных изменений МII хромосом (рис. 1), которая в контрольной группе достигала $58.0 \pm 1.9\%$ от числа созревших клеток (рис. 2). Внесение NPLA (селективного ингибитора *n*NOS) в контрольную среду старения не влияло на долю ооцитов с деструктивными изменениями метафазных хромосом (рис. 2). В то же время 1400W (селективный ингибитор *i*NOS) и L-NAME (эффективный ингибитор *e*NOS и *n*NOS) тормозили хромосомную деструкцию в ооцитах, тогда как их совместное действие вызывало обратный эффект ($P < 0.001$). Пролонгированное культивирование ОКК в присутствии L-NIO, ингибирующего все три NO-синтазы, также приводило к возраста-

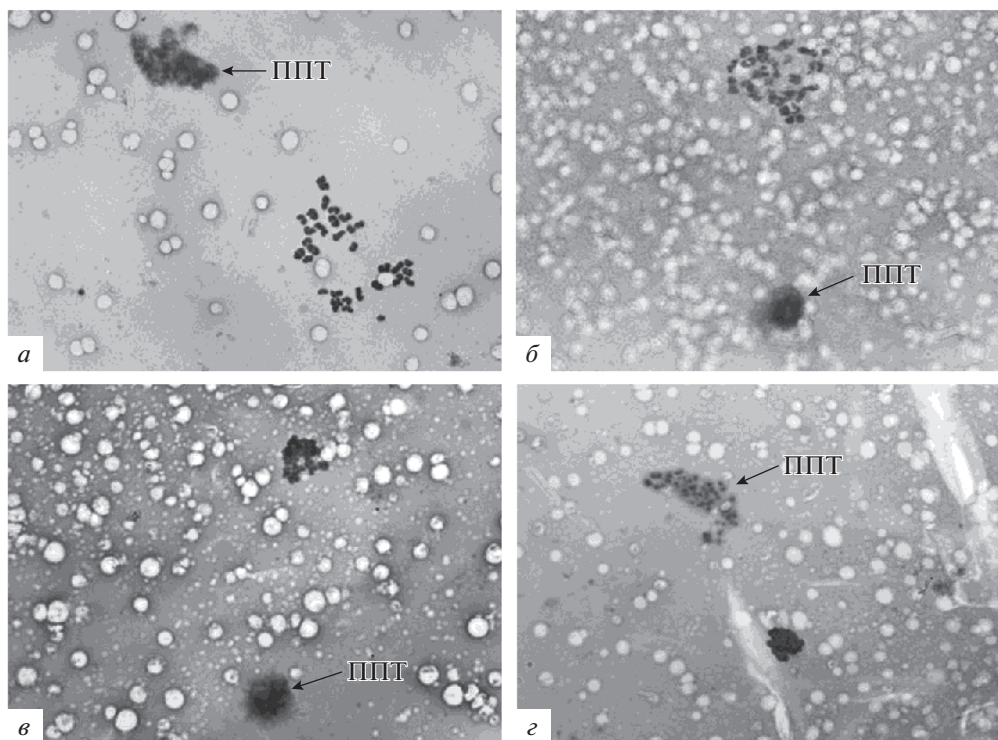


Рис. 1. Репрезентативные микрофотографии морфологии хромосом на стадии метафазы II (цитогенетические препараты) в ооцитах коров через 24 ч старения *in vitro*. *а* – Без признаков деструктивных изменений, *б* – деконденсация (неясные и неровные морфологические контуры), *в* – деконденсация и частичное слипание, *г* – образование единой комковатой массы. Стрелками показаны первые полярные тельца (ППТ). Об. 100×.

нию доли ооцитов с хромосомными нарушениями ($P < 0.001$).

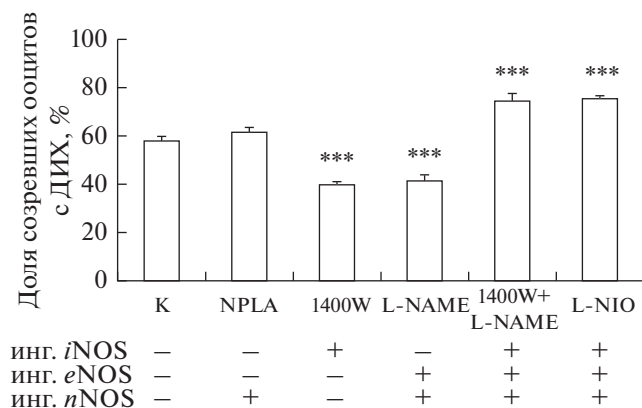


Рис. 2. Влияние ингибиторов различных изоформ NO-синтазы на деструктивные изменения метафазных хромосом (ДИХ) в процессе 24-часового старения созревших *in vitro* ооцитов коров в среде без гормонов. *Вертикальные отрезки* – стандартные ошибки средних значений. *Звездочки* над столбиками показывают достоверные различия по сравнению с контролем (К): *** $P < 0.001$. Знаки “+” и “-” обозначают соответственно наличие и отсутствие влияния ингибиторов NO-синтазы на *i*NOS, *e*NOS и *n*NOS.

Старение ОКК в присутствии ПРЛ характеризовалось снижением по сравнению с контролем частоты деструктивных изменений метафазных хромосом в ооцитах (до $42.5 \pm 2.5\%$, $P < 0.01$). Характер влияния ингибиторов NO-синтазы на хромосомные аномалии при пролонгированном культивировании ОКК в среде, содержащей ПРЛ, значительно отличался от такового в отсутствие гормона (рис. 3). Внешение NPLA, ингибитора *n*NOS, в среду с ПРЛ приводило к повышению ($P < 0.001$) доли ооцитов с аномальной трансформацией хромосом до уровня, наблюдаемого в контрольной среде без гормона (см. рис. 2). Ингибитор *i*NOS также подавлял ($P < 0.001$) тормозящее влияние ПРЛ на хромосомную деструкцию, хотя в контрольных экспериментах наблюдали уменьшение доли ооцитов с признаками деструктивных изменений при добавлении 1400W к среде культивирования. Напротив, L-NAME (ингибитор *e*NOS и *n*NOS) усиливал ($P < 0.05$) эффект ПРЛ, действуя однонаправленно с гормоном. Блокирование действия всех трех изоформ NO-синтазы с помощью L-NIO или комплекса 1400W + L-NAME обуславливало повышение ($P < 0.05$) частоты хромосомных аномалий в ооцитах, стареющих в среде с ПРЛ. Однако частота аномалий в этих случаях была ниже (по крайней мере $P < 0.05$), чем при воздействии этих ингибиторов NOS в отсутствие гормона (см. рис. 2).

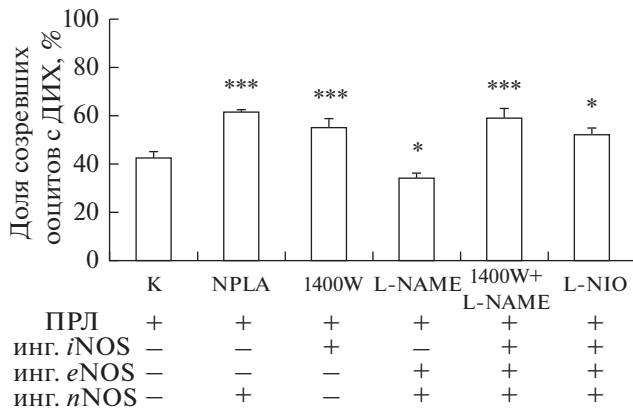


Рис. 3. Влияние ингибиторов различных изоформ NO-синтазы на деструктивные изменения метафазных хромосом (ДИХ) в процессе 24-часового старения созревших *in vitro* ооцитов коров в присутствии ПРЛ. Достоверные различия по сравнению с контролем: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. Наличие в среде ПРЛ показано знаком "+". Остальные обозначения те же, что и на рис. 2.

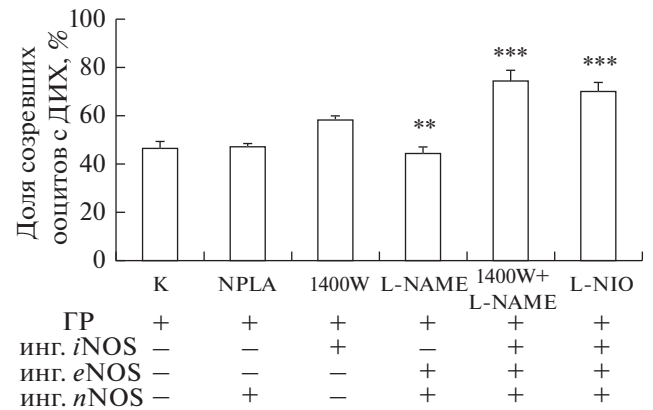


Рис. 4. Влияние ингибиторов различных изоформ NO-синтазы на деструктивные изменения метафазных хромосом (ДИХ) в процессе 24-часового старения созревших *in vitro* ооцитов коров в присутствии ГР. Достоверные различия по сравнению с контролем: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Наличие в среде ГР показано знаком "+". Остальные обозначения те же, что и на рис. 2.

Пролонгированное культивирование ОКК в среде, содержащей ГР, приводило к снижению доли ооцитов с деструктивными изменениями метафазных хромосом по сравнению с контролем (до $46.2 \pm 2.5\%$, $P < 0.05$). Характер влияния ингибиторов NO-синтазы на аномальные изменения морфологии хромосом в ооцитах, стареющих в присутствии ГР, не был полностью идентичен таковому, наблюдаемому в среде с ПРЛ (рис. 4). Так, NPLA (ингибитор *n*NOS) не ослаблял тормозящее влияние ГР на деструктивные изменения метафазных хромосом. Вместе с тем, как и в случае ПРЛ, 1400W (селективный ингибитор *i*NOS) подавлял это действие ГР ($P < 0.01$). Хотя L-NAME (эффективный ингибитор *e*NOS и *n*NOS) не оказывал никакого влияния на хромосомные трансформации в ооцитах, стареющих в присутствии ГР, он значительно усиливал ($P < 0.01$) негативный эффект ингибитора *i*NOS при совместном воздействии. Сходное повышение частоты аномальных изменений хромосом в стареющих ооцитах наблюдали и в среде, содержащей ГР и L-NIO, ингибитор всех изоформ NOS.

Исследование общей активности NO-синтазы в ооцитах, освобожденных от кумулюса через 24 ч старения, показало, что ее уровень не изменяется при воздействии ПРЛ и ГР на ОКК ни в отсутствие, ни в присутствии ингибиторов различных изоформ NO-синтазы (рис. 5). При этом гормоны и ингибиторы были использованы в концентрациях, которые были эффективны при модуляции хромосомной деструкции в окруженных кумулюсом ооцитах.

ОБСУЖДЕНИЕ

Участие оксида азота в регуляции процессов старения ооцитов млекопитающих исследовано *in vitro*

с использованием доноров NO и ингибиторов NOS (Goud et al., 2005, 2008; Nevorál et al., 2013). Показано, что индукция освобождения NO вызывает торможение ряда возрастных морфофункциональных изменений в постовуляторных ооцитах мыши, а также более длительное сохранение их способности к эмбриональному развитию, тогда как блокирование общей активности NOS оказывает противоположное действие (Goud et al., 2005, 2008). При этом позитивный эффект NO исчезает при повышении скорости его образования до определенного порогового значения. Напротив, при пролонгированном культивировании ооцитов свиней обнаружено тормозящее влияние ингибиторов NO-синтазы, снижающих продукцию NO, на апоптоз и лизис стареющих яйцеклеток (Nevorál et al., 2013). Таким образом, имеющиеся данные свидетельствуют о двойственном характере влияния NO на старение женских гамет. Сходный характер эффектов этого мессенджера также выявлен при его воздействии на созревающие фолликулы и ооциты у разных видов млекопитающих (Basini, Grasselli, 2015). Установлено, что NO может оказывать как проапоптотическое, так и антиапоптотическое действие на клетки гранулезы коров в зависимости от своей концентрации и степени зрелости фолликулов (Basini et al., 1998). Поступающий из кумулюса в ооциты NO, образованный при участии *e*NOS, стимулирует созревание ооцитов мыши при низкой концентрации и поддерживает блокаду мейоза при высокой концентрации (Nakamura et al., 2002).

Результаты представленного исследования также свидетельствуют о двойственном характере влияния NO на деструктивные изменения хромосом в стадии МП, связанные со старением ооцитов коров. Подавление активности одной из двух синтаз — или *i*NOS,

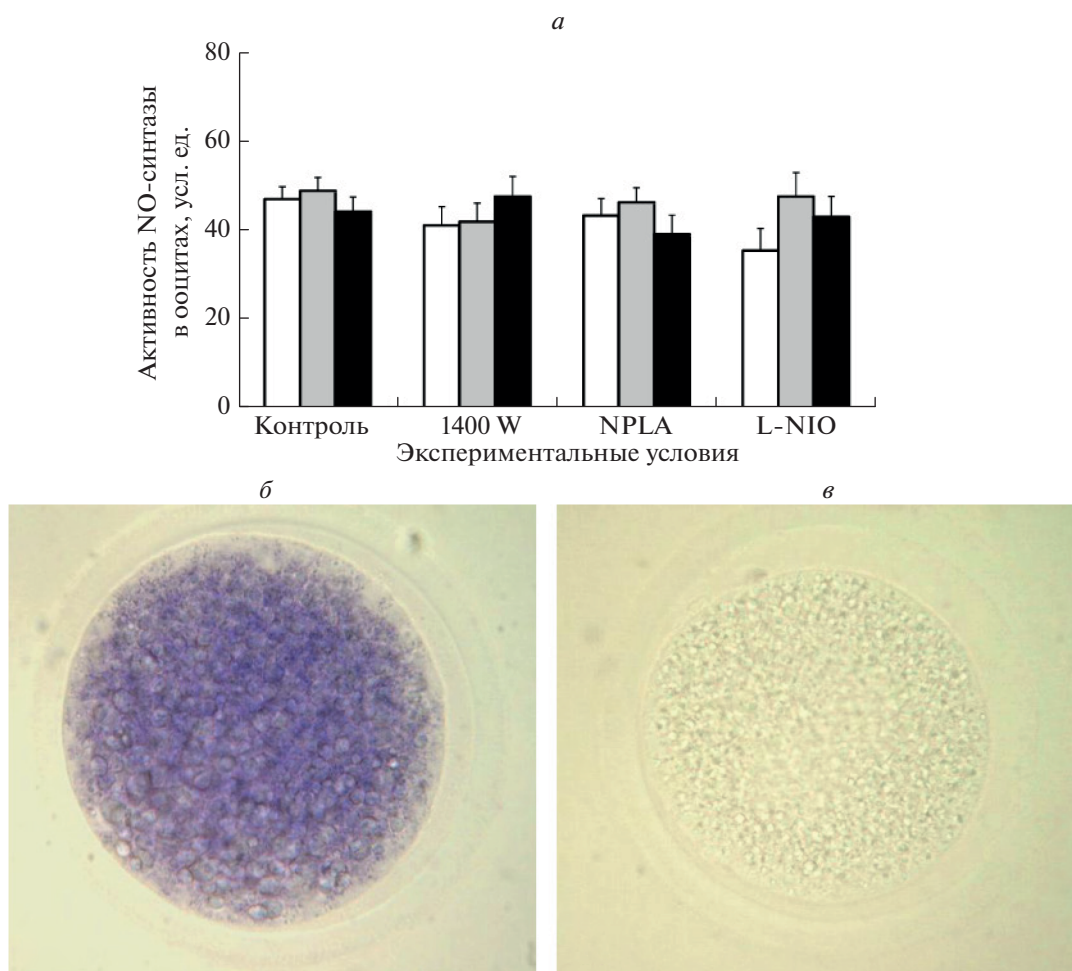


Рис. 5. Общая активность NO-синтазы в ооцитах коров через 24 ч старения *in vitro*. *а* – Уровень активности NOS в стареющих ооцитах после пролонгированного культивирования ОКК в присутствии ПРЛ, ГР и (или) ингибиторов различных изоформ NOS. *Белые столбики* – среда без гормонов, *серые столбики* – среда, содержащая ПРЛ, *черные столбики* – среда, содержащая ГР. Остальные обозначения те же, что и на рис. 2. *б, в* – Цитохимическое выявление NO-синтазы в стареющих ооцитах на основании активности NADPH диафоразы; *б* – положительная реакция, *в* – негативный контроль. Об. 40×.

или eNOS – при пролонгированном культивировании ОКК в отсутствие гормонов оказывает позитивное влияние на состояние метафазных хромосом в стареющих ооцитах, тогда как одновременная блокада активности обеих NO-синтаз ускоряет модификацию хромосом. По-видимому, уменьшение общей активности NOS (и, следовательно, продукции NO) до оптимального уровня позволяет ингибировать возрастные модификации метафазных хромосом, но ее дальнейшее снижение вызывает ускорение этих негативных процессов. При этом селективный ингибитор *n*NOS не влияет на аномальные изменения хромосом, что может свидетельствовать о низкой базальной активности нейрональной NO-синтазы в стареющих ОКК коров. Также нельзя исключить и важность внутриклеточной локализации *n*NOS для ее участия в модуляции изучаемых регуляторных путей, как показано, например, в случае ооцитов свиней (Chmelíková et al., 2010).

Полученные нами данные показывают, что эффект ПРЛ, связанный с торможением аномальных изменений хромосом в стареющих яйцеклетках коров, достигается двумя путями. Во-первых, действие ПРЛ может приводить к активации *n*NOS (или к изменению ее локализации), поскольку ингибитор последней подавляет позитивное действие гормона на ооциты, но не влияет на состояние хромосом в контрольной среде старения. Во-вторых, хотя ПРЛ влияет на хромосомную деструкцию однонаправленно с 1400 W, специфическим ингибитором *i*NOS, их совместное введение в среду старения обуславливает ослабление позитивных эффектов друг друга, как и в случае совместного действия 1400W и L-NAME (эффективного ингибитора *e*NOS и *n*NOS) в контрольной среде. Таким образом, одновременное действие ПРЛ и 1400 W, вероятно, приводит к снижению общей активности NOS (продукции NO) в ооцит-кумулюсных комплексах ниже порогового уровня. В то

же время влияние ПРЛ на метафазные хромосомы не может быть связано с активацией *i*NOS, так как в контрольной среде именно блокирование активности этой NO-синтазы подавляло хромосомную деструкцию. При этом L-NAME, также действующий однонаправленно с ПРЛ, не способен ослаблять его тормозящее влияние на возрастные модификации хромосом. В целом эти данные свидетельствуют о супрессирующем влиянии ПРЛ на активность *e*NOS в стареющих ОКК коров. Следует отметить, что при одновременном ингибировании активности всех трех изоформ NO-синтазы частота хромосомной деструкции в присутствии ПРЛ ниже, чем в его отсутствие. Это, вероятно, обусловлено стимуляцией пролактином продукции NO при участии *n*NOS, которая частично компенсирует падение общей активности NO-синтазы. Таким образом, тормозящее влияние ПРЛ на аномальные изменения метафазных хромосом в ооцитах может быть связано с инактивацией *e*NOS и с вовлечением *n*NOS в продукцию NO в стареющих ОКК коров.

Кроме того, нами установлено, что супрессирующее влияние ГР на возрастные модификации хромосом в ооцитах не зависит от присутствия в среде старения NPLA, селективного ингибитора *n*NOS. Следовательно, *n*NOS не участвует в опосредовании этого эффекта ГР. Напротив, ингибитор *i*NOS (но не *e*NOS) нивелирует влияние ГР на метафазные хромосомы. Эти результаты свидетельствуют о том, что позитивное влияние ГР на состояние метафазных хромосом в стареющих ооцитах может достигаться, как и в случае ПРЛ, путем снижения активности *e*NOS в ооцит-кумулюсных комплексах. Тем не менее разнонаправленное влияние ПРЛ на разные изоформы NOS, вероятно, позволяет ему более тонко регулировать общий уровень активности NO-синтазы по сравнению с ГР.

Ранее нами было показано, что клетки кумулюса ускоряют аномальные изменения метафазных хромосом в стареющих ооцитах коров, тогда как ПРЛ и ГР способны ослаблять это негативное влияние окружающих соматических клеток, содержащих соответствующие гормональные рецепторы (Лебедева и др., 2014; Lebedeva et al., 2015). При этом оба гормона не влияют на деструкцию хромосом в ооцитах, лишенных кумулюса. При проведении настоящего исследования было обнаружено, что ПРЛ и ГР не изменяют общую активность NO-синтазы в ооцитах. Таким образом, регуляция активности *n*NOS и (или) *e*NOS исследованными гормонами происходит на уровне клеток кумулюса, окружающих стареющие ооциты, что согласуется с нашими предыдущими исследованиями (Lebedeva et al., 2015), а также с данными о способности ПРЛ модулировать NO/NOS-систему в соматических клетках млекопитающих. Так, продемонстрировано стимулирующее влияние ПРЛ на экспрессию *n*NOS в клетках GH₃ и на ее активность в гипоталамо-гипофизарной системе крыс (Secondo et al., 2003; Vega et al., 2010). Кроме того,

ПРЛ может ингибировать продукцию NO с участием *e*NOS в клетках эндотелия, в том числе в яичнике (Duckles, Miller, 2010; Basini et al., 2014). Хотя ГР рассматривается как позитивный регулятор образования NO в эндотелии, этот эффект, вероятно, достигается путем стимуляции синтеза печенью инсулиноподобного фактора роста-1 (Duckles, Miller, 2010), продукция которого практически не наблюдается в клетках гранулы/кумулюса коров (Gutiérrez et al., 1997). Кроме того, нокаут гена рецептора ГР у мышей приводит к повышению экспрессии *e*NOS в аорте (Egecioglu et al., 2007), что указывает на неодолеваемую роль этого гормона в регуляции эндотелиальной изоформы NO-синтазы.

Клетки кумулюса, окружающие ооцит, являются специализированной субпопуляцией клеток гранулы, которая обеспечивает созревающую яйцеклетку питательными веществами и передает внешние сигналы, что необходимо для приобретения ею компетенции к дальнейшему эмбриональному развитию (Tanghe et al., 2002). В свою очередь ооциты продуцируют паракринные факторы роста, регулирующие процессы дифференцировки клеток кумулюса и предохраняющие последние от апоптоза (Gilchrist et al., 2008). В процессе старения ооциты, очевидно, утрачивают регуляторную и защитную функции, что приводит к усилению апоптоза в кумулюсных клетках, которые начинают продуцировать вещества, негативно влияющие на функциональную активность и жизнеспособность яйцеклеток (Wu et al., 2011; Zhu et al., 2015). Как известно, NO играет двойственную роль в регуляции апоптотических процессов в клетках гранулы, выступая и как индуктор, и как ингибитор апоптоза (Basini, Grasselli, 2015). В этой связи можно предположить, что воздействие ПРЛ и ГР в определенных концентрациях приводит к оптимизации продукции NO клетками кумулюса и — как следствие — к торможению апоптотической дегенерации этих клеток и их негативного действия на стареющие ооциты. Действительно, при более высоких концентрациях оба гормона ускоряют возрастные модификации хромосом в ооцитах (Lebedeva et al., 2015), что, вероятно, обусловлено неадекватной продукцией NO в кумулюсе.

В целом, полученные данные позволяют предположить, что тормозящее влияние ГР на аномальные изменения метафазных хромосом в стареющих яйцеклетках коров связано с инактивацией эндотелиальной NO-синтазы в клетках кумулюса, окружающих ооциты. В то же время сходное влияние ПРЛ может достигаться не только путем снижения активности эндотелиальной NOS, но и путем повышения продукции NO с участием нейрональной NOS, что, вероятно, позволяет ему более тонко регулировать общий уровень активности NO-синтазы в кумулюсных клетках.

Работа выполнена по государственному заданию № 0445-2019-0030 (рег. ЦИТиС № АААА-А18-118021590132-9).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Лебедева И.Ю., Кибардина Т.В., Кузьмина Т.И. 2005. Участие клеток гранулезы в опосредовании действия пролактина и соматотропина на ооцит-кумуляные комплексы коров *in vitro*. Цитология. 47(10) : 882–888. (Lebedeva I.Yu., Kibardina T.V., Kuz'mina T.I. 2005. Participation of granulosa cells in mediation of prolactin and somatotropin action on bovine oocyte-cumulus complexes *in vitro*. Tsitologiya. 47(10) : 882–888.)
- Лебедева И.Ю., Сингина Г.Н., Лопухов А.В., Зиновьева Н.А. 2014. Динамика морфофункциональных изменений в стареющих яйцеклетках коров при пролонгированном культивировании *in vitro*. Цитология. 56(1) : 57–66. (Lebedeva I.Yu., Singina G.N., Lopukhov A.V., Zinovieva N.A. 2014. Dynamics of morphofunctional changes in aging bovine ova during prolonged culture *in vitro*. Cell Tissue Biol. (Tsitologiya). 8 : 258–266.)
- Лебедева И.Ю., Сингина Г.Н., Эрнст Л.К., Голубев А.К. 2009. Пути реализации модулирующего влияния пролактина на цАМФ-зависимый механизм регуляции мейоза в ооцитах коров. Цитология. 51(7) : 559–564. (Lebedeva I. Yu., Singina G.N., Ernst L.K., Golubev A.K. 2009. Realization pathways of prolactin modulating effect on the cAMP-dependent mechanism of meiosis regulation in bovine oocytes. Cell Tissue Biol. (Tsitologiya). 3 : 438–444.)
- Al-Edani T., Assou S., Ferrières A., Bringer Deutsch S., Gala A., Lecellier C.H., Ait-Ahmed O., Hamamah S. 2014. Female aging alters expression of human cumulus cells genes that are essential for oocyte quality. Biomed. Res. Int. 2014 : 964614.
- Basini G., Baioni L., Bussolati S., Grolli S., Grasselli F. 2014. Prolactin is a potential physiological modulator of swine ovarian follicle function. Regul. Pept. 189 : 22–30.
- Basini G., Baratta M., Ponderato N., Bussolati S., Tamanini C. 1998. Is nitric oxide an autocrine modulator of bovine granulosa cell function? Reprod. Fertil. Develop. 10 : 471–478.
- Basini G., Grasselli F. 2015. Nitric oxide in follicle development and oocyte competence. Reproduction. 150 : R1–R9.
- Battaglia D.E., Goodwin P., Klein N.A., Soules M.R. 1996. Influence of maternal age on meiotic spindle assembly in oocytes from naturally cycling women. Hum. Reprod. 11 : 2217–2222.
- Broekmans F.J., Soules M.R., Fauser B.C. 2009. Ovarian aging: mechanisms and clinical consequences. Endocrinol. Rev. 30 : 465–493.
- Cecconi S., Rossi G., Deldar H., Cellini V., Patacchiola F., Carta G., Macchiarelli G., Canipari R. 2014. Post-ovulatory aging of mouse oocytes affects the distribution of specific spindle-associated proteins and Akt expression levels. Reprod. Fertil. Develop. 26 : 562–569.
- Chmeliková E., Jeseta M., Sedmíková M., Petr J., Tůmová L., Kott T., Lipová P., Jílek F. 2010. Nitric oxide synthase isoforms and the effect of their inhibition on meiotic maturation of porcine oocytes. Zygote. 18 : 235–244.
- Drew B., Leeuwenburgh C. 2002. Aging and the role of reactive nitrogen species. Ann. N.Y. Acad. Sci. 959 : 66–81.
- Dubey P.K., Tripathi V., Singh R.P., Saikumar G., Nath A., Pratheesh, Gade N., Sharma G.T. 2012. Expression of nitric oxide synthase isoforms in different stages of buffalo (*Bubalus bubalis*) ovarian follicles: effect of nitric oxide on *in vitro* development of preantral follicle. Theriogenology. 77 : 280–291.
- Duckles S.P., Miller V.M. 2010. Hormonal modulation of endothelial NO production. Pflugers Arch. 459 : 841–851.
- Egecioglu E., Andersson I.J., Bollano E., Palsdottir V., Gabrielson B.G., Kopchick J.J., Skott O., Bie P., Isgaard J., Bohlooly Y.M., Bergström G., Wickman A. 2007. Growth hormone receptor deficiency in mice results in reduced systolic blood pressure and plasma renin, increased aortic eNOS expression, and altered cardiovascular structure and function. Amer. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 292 : E1418–E1425.
- Eichenlaub-Ritter U., Vogt E., Yin H., Gosden R. 2004. Spindles, mitochondria and redox potential in ageing oocytes. Reprod. Biomed. Online. 8 : 45–58.
- Gilchrist R.B., Lane M., Thompson J.G. 2008. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. Hum. Reprod. Update. 14 : 159–177.
- Goud A.P., Goud P.T., Diamond M.P., Abu-Soud H.M. 2005. Nitric oxide delays oocyte aging. Biochemistry. 44 : 11361–11368.
- Goud P.T., Goud A.P., Diamond M.P., Gonik B., Abu-Soud H.M. 2008. Nitric oxide extends the oocyte temporal window for optimal fertilization. Free Radic. Biol. Med. 45 : 453–459.
- Goud P.T., Goud A.P., Najafi T., Gonik B., Diamond M.P., Saed G.M., Zhang X., Abu-Soud H.M. 2014. Direct real-time measurement of intra-oocyte nitric oxide concentration *in vivo*. PLoS ONE. 9 : e98720.
- Gutiérrez C.G., Campbell B.K., Armstrong D.G., Webb R. 1997. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) production by bovine granulosa cells *in vitro* and peripheral IGF-I measurement in cattle serum: an evaluation of IGF-binding protein extraction protocols. J. Endocrinol. 153 : 231–240.
- Hattori M., Tabata S. 2006. Nitric oxide and ovarian function. Anim. Sci. J. 77 : 275–284.
- Homa S.T. 1988. Effects of cyclic AMP on the spontaneous meiotic maturation of cumulus-free bovine oocytes cultured in chemically defined medium. J. Exp. Zool. 248 : 222–231.
- Lebedeva I.Y., Singina G.N., Lopukhov A.V., Shedova E.N., Zinovieva N.A. 2015. Prolactin and growth hormone affect metaphase-II chromosomes in aging oocytes via cumulus cells using similar signaling pathways. Front. Genet. 6 : 274.
- Liang X., Ma J., Schatten H., Sun Q. 2012. Epigenetic changes associated with oocyte aging. Sci. China Life Sci. 55 : 670–676.
- McGinnis L.K., Pelech S., Kinsey W.H. 2014. Post-ovulatory aging of oocytes disrupts kinase signaling pathways and lysosome biogenesis. Mol. Reprod. Develop. 81 : 928–945.
- Miao Y.L., Kikuchi K., Sun Q.Y., Schatten H. 2009. Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility. Hum. Reprod. Update. 15 : 573–585.
- Nakamura Y., Yamagata Y., Sugino N., Takayama H., Kato H. 2002. Nitric oxide inhibits oocyte meiotic maturation. Biol. Reprod. 67 : 1588–1592.
- Nevorál J., Krejčová T., Petr J., Melicharová P., Vyskočilová A., Dvořáková M., Weingartová I., Chmeliková E., Tůmová L., Hošková K., Kučerová-Chrpová V., Sedmíková M. 2013. The role of nitric oxide synthase isoforms in aged porcine oocytes. Czech J. Anim. Sci. 58 : 453–459.
- Nishikimi A., Matsukawa T., Hoshino K., Ikeda S., Kira Y., Sato E.F., Inoue M., Yamada M. 2001. Localization of nitric oxide synthase activity in unfertilized oocytes and fertilized embryos during preimplantation development in mice. Reproduction. 122 : 957–963.

- Pandey A.N., Tripathi A., Premkumar K.V., Shrivastav T.G., Chaube S.K. 2010. Reactive oxygen and nitrogen species during meiotic resumption from diplotene arrest in mammalian oocytes. *J. Cell. Biochem.* 111 : 521–528.
- Petr J., Krejčová M., Rajmon R., Jilek F. 2011. Activation of protein kinase C suppresses fragmentation of pig oocytes aged *in vitro*. *Animal* 5 : 565–571.
- Pires P.R., Santos N.P., Adona P.R., Natori M.M., Schwarz K.R., de Bem T.H., Leal C.L. 2009. Endothelial and inducible nitric oxide synthases in oocytes of cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 116 : 233–243.
- Premkumar K.V., Chaube S.K. 2015. Nitric oxide signals post-ovulatory aging-induced abortive spontaneous egg activation in rats. *Redox Rep.* 20 : 184–192.
- Secondo A., Sirabella R., Formisano L., D'Alessio A., Castaldo P., Amoroso S., Ingleton P., Di Renzo G., Annunziato L. 2003. Involvement of PI3'-K, mitogen-activated protein kinase and protein kinase B in the up-regulation of the expression of nNOSalpha and nNOSbeta splicing variants induced by PRL-receptor activation in GH3 cells. *J. Neurochem.* 84 : 1367–1377.
- Takahashi T., Igarashi H., Kawagoe J., Amita M., Hara S., Kurachi H. 2009. Poor embryo development in mouse oocytes aged *in vitro* is associated with impaired calcium homeostasis. *Biol. Reprod.* 80 : 493–502.
- Tanghe S., Van Soom A., Nauwynck H., Coryn M., de Kruif A. 2002. Minireview: functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Mol. Reprod. Develop.* 61 : 414–424.
- Tatone C., Amicarelli F., Carbone M.C., Monteleone P., Caserta D., Marci R., Artini P.G., Piomboni P., Focarelli R. 2008. Cellular and molecular aspects of ovarian follicle ageing. *Hum. Reprod. Update.* 14 : 131–142.
- Tatone C., Carbone M.C., Gallo R., Delle Monache S., Di Cola M., Alesse E., Amicarelli F. 2006. Age-associated changes in mouse oocytes during postovulatory *in vitro* culture: possible role for meiotic kinases and survival factor BCL2. *Biol. Reprod.* 74 : 395–402.
- Te Velde E.R., Pearson P.L. 2002. The variability of female reproductive ageing. *Hum. Reprod. Update* 8 : 141–154.
- Tian X.C., Lonergan P., Jeong B.S., Evans A.C., Yang X. 2002. Association of MPF, MAPK, and nuclear progression dynamics during activation of young and aged bovine oocytes. *Mol. Reprod. Develop.* 62 : 132–138.
- Vega C., Moreno-Carranza B., Zamorano M., Quintanar-Stéphano A., Méndez I., Thebault S., Martínez de la Escalera G., Clapp C. 2010. Prolactin promotes oxytocin and vasopressin release by activating neuronal nitric oxide synthase in the supraoptic and paraventricular nuclei. *Amer. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 299 : R1701–R1708.
- Wu Y., Wang X.L., Liu J.H., Bao Z.J., Tang D.W., Wu Y., Zeng S.M. 2011. BIM EL-mediated apoptosis in cumulus cells contributes to degenerative changes in aged porcine oocytes via a paracrine action. *Theriogenology.* 76 : 1487–1495.
- Zhang G.M., Gu C.H., Zhang Y.L., Sun H.Y., Qian W.P., Zhou Z.R., Wan Y.J., Jia R.X., Wang L.Z., Wang F. 2013. Age-associated changes in gene expression of goat oocytes. *Theriogenology.* 80 : 328–336.
- Zhu J., Zhang J., Li H., Wang T.Y., Zhang C.X., Luo M.J., Tan J.H. 2015. Cumulus cells accelerate oocyte aging by releasing soluble Fas ligand in mice. *Sci. Rep.* 5 : 8683.

THE ROLE OF DIFFERENT NO-SYNTASE ISOFORMS IN REGULATORY EFFECTS OF PROLACTIN AND GROWTH HORMONE ON THE STATE OF CHROMOSOMES IN MATURED OOCYTES AGING *IN VITRO*

I. Yu. Lebedeva^{a,*}, G. N. Singina^a, E. N. Shedova^a, A. V. Lopukhov^a, N. A. Zinovieva^a

^aErnst Federal Science Center for Animal Husbandry, Podolsk–Dubrovitsy, Russia

*e-mail: irledv@mail.ru

Fertility of mammalian females depends on the oocyte quality that declines during biological aging. We have previously found the inhibiting action of two related pituitary hormones, prolactin (PRL) and growth hormone (GH), on destructive modifications of metaphase chromosomes in bovine (*Bos taurus taurus*) ova aging *in vitro*. In the present work, a participation of different NO-synthase (NOS) isoforms in implementation of PRL and GH effects on age-related changes of MII chromosomes during the prolonged culture of *in vitro* matured bovine oocytes was studied. In the absence of the hormones, NPLA, an inhibitor of neuronal NOS (*n*NOS), did not affect the frequency of chromosome abnormalities in aging oocytes. At the same time 1400W, an inhibitor of inducible NOS (*i*NOS), and L-NAME, an effective inhibitor of endothelial NOS (*e*NOS) and *n*NOS, decreased this frequency, whereas blocking of all three isoforms of NO-synthase led to the opposite effect. The inhibitory effect of PRL on destructive modifications of chromosomes in aging ova increased in the presence of L-NAME but was not expressed when inhibiting *n*NOS, *i*NOS or simultaneously all NO-synthase isoforms. Neither NPLA or L-NAME modulated the suppressing action of GH on abnormal changes of oocyte chromosomes. In contrast, blocking of *i*NOS, as well as all three isoforms of NO-synthase resulted in an increase in the proportion of oocytes with destructive changes in M-II chromosomes. Meanwhile, the level of the total activity of NO-synthase in oocytes did not depend on the presence of the investigated hormones or NOS inhibitors during the prolonged culture of cumulus-oocyte complexes. The findings permit to assume that the inhibiting effect of PRL and GH on abnormal changes of metaphase chromosomes in aging bovine ova is related to a reduction in the activity of endothelial NO-synthase and also, in the case of PRL, to an increase in the activity of neuronal NO-synthase in cumulus cells surrounding oocytes.

Keywords: oocyte aging, metaphase chromosomes, prolactin, growth hormone, NO-synthase, cumulus cells