

УДК 611.651.15:546.172.6

## УЧАСТИЕ ОКСИДА АЗОТА В ОВАРИАЛЬНОМ ЦИКЛЕ

Зенкина В.Г., Солодкова О.А.

*ГБОУ ВПО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России (690950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2), e-mail: zena-74@mail.ru*

**Обзор литературы и данных собственных исследований, посвященный динамике овариальных изменений у млекопитающих и человека и роли оксида азота в регулировании преобразований и функции женской гонады. Представлено обоснование участия NO в модуляции функции яичников, о чем свидетельствует ряд исследований, направленных на демонстрацию продукции оксида азота в яичнике и на уточнение его роли в регуляции стероидогенеза, развития фолликулов, овуляции, лютеиновой функции и лютеиновой регрессии. Приведены результаты последних работ и установлена прямая зависимость между уровнем NO в яичниках и гибелью фолликулярных и половых клеток. Знания о топохимии, механизмах и роли газотрансмиттеров в важнейшем органе репродуктивной системы – яичнике фрагментарны и не позволяют сформировать целостного представления о клеточных механизмах, при помощи которых последние оказывают регулирующее влияние на отдельные структуры яичника в обычных условиях жизнедеятельности организма и при патологии.**

Ключевые слова: оксид азота, яичник, овариальный цикл.

## THE INVOLVEMENT OF NITRIC OXIDE IN THE OVARIAN CYCLE

Zenkina V. G., Solodkova O.A.

*Pacific State Medical University, Vladivostok, Russia (690950, Vladivostok, Ostryakova Ave. 2), e-mail: zena-74@mail.ru*

**Review of literature and own data studies on the dynamics of ovarian changes in mammals and humans, and the role of nitric oxide in the regulation of transformations and functions of the female gonads. Provided the rationale about the involvement of NO in the modulation of ovarian function, as evidenced by a number of studies aimed at demonstrating the nitric oxide production in the ovary and to clarify its role in the regulation steroidogenesis, follicular development, ovulation, luteal function and luteal regression. The results of recent work and is a direct correlation between the level of NO in the ovaries and death and follicular germ cells. Knowledge of topochemistry, mechanisms and the role of these substances in the important organs of the reproductive system – ovary, fragmentary and do not allow to form a holistic understanding of the cellular mechanisms by which Gasotransmitters have a regulating effect on the individual structures of the ovary in normal functioning of the body and disease.**

Keywords: nitric oxide, the ovary, the ovarian cycle.

Процесс созревания ооцитов млекопитающих регулируется гормонами, ростовыми факторами, циклическими нуклеотидами и другими веществами, которые воздействуют как на ооцит, фолликулярные клетки (кумулясные и гранулярные), образующие с ооцитом метаболически единую систему, так и сосудистую систему гонад. Регулирование развития ооцита млекопитающих и процесс возобновления мейотического созревания активно изучают [1, 2, 3, 4, 6]. В настоящее время появляется все больше доказательств использования позвоночными разнообразных путей передачи сигналов в процессе регуляции гомеостаза. Существенную роль здесь играют молекулы оксида азота (NO), монооксида углерода и сероводорода. Оксид азота является эффективным посредником многообразных биологических эффектов, в частности, через активацию растворимой гуанилатциклазы [5]. Среди мишеней: тонус гладких мышечных клеток, агрегация тромбоцитов и адгезия, клеточный рост и апоптоз, синапсис [5, 8, 10]. Так как эти механизмы связаны с

патофизиологией некоторых репродуктивных процессов, стало ясно, что NO может играть значительную роль в репродукции.

**NO и функции яичников.** Об участии NO в модуляции функции яичников свидетельствует ряд исследований, направленных на демонстрацию продукции оксида азота в яичнике и на уточнение его роли в регуляции стероидогенеза, развития фолликулов, овуляции, лютеиновой функции и лютеиновой регрессии [6, 11, 13, 16].

**NO и фолликулогенез.** Хорошо известно, что фолликулогенез и овуляция регулируются множеством факторов, таких как цитокины, факторы роста, а также местные факторы регуляции, среди которых оксид азота, по-видимому, играет важную роль. Уровень оксида азота, как было показано, изменяется с ростом фолликулов. Развитие фолликулов у неполовозрелых крыс, связано с увеличением экспрессии eNOS (но не iNOS), но последующая стимуляция ХГЧ вызывает увеличение обеих изоформ фермента [12, 19]. С другой стороны, описано снижение уровня mPHKiNOS в гранулезных клетках незрелых фолликулов крыс, следовательно, оксид азота может представлять собой цитостатический фактор [22]. Эта гипотеза была усилена результатами недавних исследований, проведенных на крысах, которые также показывают, что ГнРГ и эндотелиальный фактор роста индуцируют снижение уровня mPHKiNOS [9, 15].

В отличие от предыдущих исследований, рост-стимулирующее влияние NO поддерживается наблюдениями, что оксид азота увеличивает количество рецепторов к эндотелиальному фактору роста в гранулезных клетках яичника крысы [9]. Однако обработка гранулезных клеток фолликулов разных размеров у крупного рогатого скота донорами NO (SNAP) не влияет на пролиферацию [12]. Вышеприведенные результаты свидетельствуют о том, что точная роль NO в регуляции роста клеток еще до конца не изучена. Возможно, что эффект оксида азота сильно зависит от взаимодействия с другими модулирующими факторами роста, действующими внутри яичника [4, 5].

**NO в фолликулярной жидкости и апоптоз фолликулярных клеток.** Механизмом, через который NO может быть вовлечен в контроль развития фолликулов, является его влияние на апоптоз, запрограммированную гибель клеток, за счет которых большинство фолликулов яичников элиминируются во время постнатальной жизни [2, 5]. Различные данные некоторых авторов, изучавших человеческие клетки гранулезы, не подтверждают участие оксида азота в регуляции апоптоза. NO может также влиять на развитие фолликула, опосредуя эффект гонадотропинов через фолликулярный барьер, таким образом, влияя на его проницаемость для различных веществ.

Считают, что NO в фолликулярной жидкости продуцируется eNOS гранулезных клеток, поскольку среди изолированных человеческих фолликулярных клеток по крайней

мере 90 % – это клетки гранулезы [7]. Незначительная разница в уровне NO в больших и малых фолликулах предполагает различия в ответах на NO в разных типах фолликулов. Сообщают об отсутствии корреляции между фолликулярным уровнем NO и зрелостью или качеством фолликула [14].

Показана взаимозависимость в концентрации NO, фолликулярного роста и апоптоза клеток фолликулярного эпителия [23]. Есть данные о том, что низкие концентрации NO предотвращают апоптоз, тогда как высокие концентрации NO, как и усиленная генерация пероксинитрита из-за недостатка аргинина, увеличивают апоптоз эпителиальных клеток фолликула. Кроме того, ИЛ-1 $\beta$ -индуцированный антиапоптотический эффект также NO-опосредованный [21]. В малых фолликулах пациенток программы ЭКО процент апоптотических фолликулярных клеток с ядерной фрагментацией выше в сравнении с таковым в больших фолликулах [24]. Данные литературы позволяют утверждать, что NO вовлечен в фолликулогенез и апоптотическую гибель фолликулярных клеток и принимает участие в регуляции мейотического созревания ооцитов. Ингибирование апоптоза с участием NO ассоциировано с активацией гуанилатциклазы, индукцией антиапоптотических механизмов за счет гемоксигеназы и циклооксигеназ, ингибированием каспаз за счет S-нитрозилирования или через цГМФ-зависимые механизмы, ведущие к активации каспаз, индукции белка теплового шока Hsp70, а также подавлению экспрессии гена Bax [17].

Установлено, что NO изменяет ДНК-связывающую активность многих транскрипционных факторов за счет S-нитрозилирования тиоловых групп цистеина и последующего образования S-нитрозотиолов, что служит пусковым механизмом трансдукции сигнала. С помощью S-нитрозилирования может регулироваться функция многих тиолсодержащих ферментов, включая транскрипционные факторы NF- $\kappa$ B и СКЕВ [5]. NF- $\kappa$ B, в свою очередь, может стимулировать экспрессию антиапоптотических генов bcl-XL, x-IAP, cI-API, cIAP2 и A20 [3, 5].

Зависимость направленности апоптотической реакции от концентрации NO прослеживается на примере функционирования митохондрий. Эти органеллы содержат большое количество гемсодержащих, а также железо- и серосодержащих белков, с которыми NO активно соединяется [25]. Было показано, что NO в низких концентрациях оказывает стабилизирующее действие на мембрану митохондрий, высокие же концентрации разобщают окислительное фосфорилирование на уровне цитохромоксидазы, увеличивая количество супероксидного аниона и синтез пероксинитрита. Пероксинитрит, в свою очередь, ингибирует практически все компоненты электронной транспортной цепи путем окисления цистеина, нитрозилирования тирозина и повреждения Fe-S-центров белков. Пероксинитрит

приводит к открытию пор во внешней митохондриальной мембране, усугубляя процессы дегенерации [25].

Обобщая результаты о влиянии NO на фолликулогенез можно предположить, что местная продукция оксида азота способствует модулированию развития фолликула и, возможно, предотвращает апоптоз, по крайней мере, в низких концентрациях, в то время как высокие уровни могут способствовать гибели клеток через образование пероксинитрита.

**NO и овуляция.** Процесс овуляции зависит от скоординированной активности гонадотропинов и стероидных гормонов, а также медиаторов, вовлеченных в воспалительные реакции, такие как цитокины, простагландины, лейкотриены и так далее. Результаты недавних исследований свидетельствуют о вовлеченности NOS/NO системы в овуляторный механизм, в основном посредством его воздействия на сосудистую сеть и простагландины. Местное применение ингибиторов iNOS подавляет процесс овуляции у крыс. Аналогичные результаты были получены при ХГЧ-обработке кроликов и системного определения блокаторов NO, тормозящих овуляцию и подавляющих положительное влияние ИЛ-1 на ЛГ-индуцированную овуляцию у крыс [11, 12, 21]. Роль eNOS в овуляции кажется более важной, чем iNOS, даже если результаты по-прежнему противоречивые. На самом деле, у крысы текальный и стромальный компартменты экспрессируют высокий уровень eNOS во время овуляции. Кроме того, недостаточность eNOS у мышей показывает взаимосвязь с уменьшением овуляторного потенциала после индукции суперовуляции и при недостаточности eNOS у самок с нокаутированным геном наблюдалось значительное снижение ХГЧ-индуцированной овуляции [11]. Возможный механизм стимуляции овуляторного процесса с помощью NO включает в себя выработку простагландинов (ПГ), которые усиливают воспалительный процесс в перивуляторный период путем прямой активации циклооксигеназы [11]. Перекрест биосинтетических путей между NO и ПГ наблюдается также, как и стимулирующий эффект от NO на продукцию ПГF<sub>2α</sub> в больших фолликулах у коров. Было высказано предположение, что оксид азота может способствовать разрыву фолликула через увеличение внутрифолликулярного давления, либо за счет усиления сосудистого кровотока и пропотевания жидкости в полость фолликула, стимулируя сократительные элементы стенки фолликула [12]. По утверждению авторов, именно NO запускает увеличение притока крови в яичник, что важно для осуществления овуляции [10].

**NO и созревание ооцитов.** Синтез оксида азота, вероятно, также будет иметь важное значение для созревания яйцеклетки, так как у мышей с нокаутированным геном eNOS выявлено уменьшение числа ооцитов в метафазе II мейоза и высокий процент яйцеклеток остался в метафазе I [20]. Определено влияние блокаторов NOS и доноров NO на количество овариальных ооцитов мышей на разных стадиях эстрального цикла и на способность таких

ооцитов осуществлять мейотическое созревание *invitro* [21]. Доноры NO увеличивают количество овариальных ооцитов и их способность к возобновлению мейоза у самок мышей на стадии проэструса, стимулируют способность ооцитов к завершению мейотического созревания у мышей на стадии как диэструса, так и проэструса. Под влиянием доноров NO увеличивается количество ооцитов с атипической морфологией. Блокаторы NOS уменьшают количество овариальных ооцитов, влияют на количество ооцитов с атипической морфологией и угнетают мейотическое созревание ооцитов на всех стадиях эстрального цикла у мышей. Максимальное уменьшение количества овариальных ооцитов происходит у самок мышей на стадии эструса, а максимальное угнетение способности к завершению мейотического созревания овариальными ооцитами – на стадии проэструса [1, 21].

Известно, что NO увеличивает уровень циклического цГМФ в клетках-мишенях [14, 15]. Считают, что именно цГМФ с помощью активации ооцитарной цАМФ-фосфодиэстеразы уменьшает уровень цАМФ и запускает созревание ооцитов [19]. Есть данные о том, что сосредоточение цГМФ в кумулюсно-ооцитарных клеточных комплексах не является ответственным за влияние NO на мейотическое созревание ооцитов, а временное уменьшение внутриооцитарного уровня NO может вызвать возобновление мейотического созревания ооцитов млекопитающих [20].

Экспериментальные данные с использованием донора и блокатора NOS показывают, что NO, продуцируемый кумулюсными клетками, оказывает регуляторное влияние на уровень митохондриальной полярности в субплазмолеммальной цитоплазме соответствующего ооцита. Культивирование изолированных и окруженных клетками кумулюса ооцитов в условиях низкой и высокой концентрации кислорода предполагает, что конкурирование между кислородом и NO на уровне митохондрий может регулировать уровень митохондриальной полярности и поддерживать митохондриальный гомеостаз в преовуляторном ооците, а также сдвигать его в сторону более высоких значений (полярности), которые регистрируются после овуляции [23, 25].

Таким образом, NO – важный регуляторный агент в обеспечении нормальной овуляции, особенно в период роста и созревания главного фолликула, содержащего внутри себя ооцит.

**NO и желтое тело.** Некоторыми авторами показано, что на всех стадиях фолликулярного развития клетки желтого тела (КЖТ) синтезировали оксид азота, и скорость его синтеза была максимальной в КЖТ из лютеинизированных яичников. Используя иммунофлуоресцентный анализ, показали, что КЖТ из лютеинизированных яичников экспрессируют как эндотелиальную, так и индуцибельную формы синтазы оксида азота.

Авторы считают, что оксид азота вовлечен в функциональную регрессию желтых тел за счет подавления им стероидогенеза [11].

Многие факторы свидетельствуют о том, что NO участвует в регуляции развития и функции желтого тела, но эти данные не однозначны и противоречивы. Mottaetal. (2001) отмечают, что в стадию расцвета желтого тела NO стимулирует как глутатион, основной антиоксидант, так и прогестерон, тем самым способствуя поддержанию желтого тела [16]. Оксид азота вместе с ПГЕ воздействует на сосудистую сеть и протеолитические процессы. Недавние результаты указывают на то, что iNOS-опосредованная NO секреция стимулирует синтез ПГЕ, который в свою очередь, эффективно повышает продукцию прогестерона. Положительный эффект оксида азота на синтез прогестерона в лютеиновых клетках также был показан и у крыс. Авторы предположили, что NO может уменьшить или предотвратить лютеолитический эффект простагландинов и, таким образом, поддержать адекватный уровень прогестерона, но точные механизмы, с помощью которых он оказывает это действие, остаются до конца не изученными. Оксид азота также, возможно, участвует в контроле лютеиновой васкуляризации. В самом деле, NO, вырабатываемый эндотелиальными лютеиновыми клетками, увеличивает приток крови, стимулируя расслабление гладких мышц артериол, и способствует ангиогенезу за счет увеличения продукции сосудистого эндотелиального фактора роста в капиллярных клетках [18]. Экспрессия eNOS, а также общая активность NOS, уменьшается со старением желтого тела у различных животных и человека [2, 18].

**Заключение.** К настоящему времени, несмотря на интенсивные исследования роли газотрансмиттеров в реализации внутриклеточных преобразований в различных органах, не существует детальной картины данного процесса в важнейшем органе репродуктивной системы – яичнике. Различные механизмы, активирующие или подавляющие стероидогенез, фолликулогенез и сосудистые реакции, тесно переплетены между собой и, зачастую, трудно выделить конкретное влияние NO. Сегодня накоплено равное количество фактических данных, свидетельствующих как о защитных, так и о цитотоксических эффектах NO, H<sub>2</sub>S и CO, иногда напрямую противоречащих друг другу. Четкого представления о механизмах и зависимости овариального цикла от присутствия оксида азота в настоящее время не сложилось и требует дальнейших исследований. Создание экспериментальной модели и изучение влияния газовых посредников на преобразования в яичниках позволит получить фундаментальные знания для разработки подходов к лечению заболеваний репродуктивной системы.

## Список литературы

1. Зенкина В.Г., Каредина В.С., Солодкова О.А. и др. Морфология яичников андрогенизированных крыс на фоне приема экстракта из кукумарии // Тихоокеан. мед. журн. – 2007. – № 4. – С. 70-72.
2. Зенкина В.Г., Каредина В.С., Солодкова О.А., Михайлов А.О. Регуляторы апоптоза и механизм их действия в женской гонаде // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2010. – № 7. – С. 7-14.
3. Зенкина В.Г. Значение апоптоза в яичниках при развитии некоторых заболеваний репродуктивной системы // Фундаментальные исследования. – 2011. – № 6. – С. 227-230.
4. Зенкина В.Г., Солодкова О.А., Погукай О.Н., Каредина В.С. Современные представления об интраорганной регуляции фолликулогенеза в яичнике // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 2. [www. science-education.ru](http://www.science-education.ru)
5. Рязанцева Н.В., Старикова Е.Г., Таширева Л.А. и др. Внутриклеточные газовые посредники оксид азота, монооксид углерода и сульфид водорода участвует в регуляции апоптоза // Цитология. – 2012. – Т. 54, № 2. – С. 105-111.
6. Черток В.М., Зенкина В.Г., Каргалова Е.П. Функциональная морфология яичника. – Владивосток: Медицина ДВ, 2015. – 152 с.
7. Basini, G., Tamanini C. Interrelationship between nitric oxide and prostaglandins in bovine granulosa cells // Prostaglandins Other Lipid Med. 2001. Vol. 66. P. 179-202.
8. Bilodeau-Goeseels S. Effects of manipulating the nitric oxide/cyclic GMP pathway on bovine oocyte meiotic resumption in vitro // Theriogenology. 2007. Vol. 68. № 5. P. 693-701.
9. Boiti C., Zampini D., Guelfi G. et al. Expression patterns of endothelial and inducible nitric oxide synthase isoforms in corpora lutea of pseudopregnant rabbits at different luteal stages // J. Endocrinol. 2002. Vol. 173. P. 285-296.
10. Goud P., Goud A., Diamond M. et al. Nitric oxide extends the oocyte temporal window for optimal fertilization // Free Radic Biol Med. 2008. Vol. 45. № 4. P. 453-459.
11. Yamauchi J., Miyazaki T., Iwasaki S. et al. Effects of Nitric Oxide on Ovulation and Ovarian Steroidogenesis and Prostaglandin Production in the Rabbit // Endocrinology. 2014. Vol. 138. № 9. P. 3630-3637.
12. Lapointe J., Roy M., St-Pierre I. et al. Hormonal and spatial regulation of nitric oxide synthases (NOS) (neuronal NOS, inducible NOS, and endothelial NOS) in the oviducts // Endocrinology. 2006. Vol. 147. № 12. P. 5600-5610.
13. Lyall F., Bulmer J.N., Kelly H., et al. Human trophoblast invasion and spiral artery transformation: the role of nitric oxide // Am. J. Pathol. 1999. Vol. 154. № 4. P. 1105-1114.

14. Maul H., Longo M., Saade G., Garfield R. Nitric oxide and its role during pregnancy: from ovulation to delivery // *Curr. Pharm. Des.* 2003. Vol. 9. № 5. P. 359-380.
15. Moncada S., Higgs E. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology // *Br. J. Pharmacol.* 2006. Vol. 147. № 1. P. 193-201.
16. Motta A.B., Franchi A.M., Gimeno M.F. Role of nitric oxide on uterine and ovarian prostaglandin synthesis during luteolysis in the rat // *Prostagland., Leukotrienes and Essent. Fatty Acids.* 1997. Vol. 56. № 4. P. 265-269.
17. Mutlag A.M., Wang X., Yang Z. et al. Study on matrix metalloproteinase 1 and 2 gene expression and NO in dairy cows with ovarian cysts // *AnimReprod Sci.* 2015. Vol. 152. P. 1-7.
18. Olson L.M., Jones-Burton C.M., Jablonka-Shariff A. Nitric oxide decreases estradiol synthesis of rat luteinized ovarian cells: possible role for nitric oxide in functional luteal regression // *Endocrinology.* 1996. Vol. 137. № 8. P. 3531-3539.
19. Pallares P., Garcia-Fernandez R., Criado L. et al. Disruption of the endothelial nitric oxide synthase gene affects ovulation, fertilization and early embryo survival in a knockout mouse model // *Reproduction.* 2008. Vol. 136. № 5. P. 573-579.
20. Pandey A., Tripathi A., Premkumar K. et al. Reactive oxygen and nitrogen species during meiotic resumption from diplotene-arrest in mammalian oocytes // *J. Cell Biochem.* 2010. Vol. 111. № 3. P. 521-528.
21. Schwarz K., Pires P., Adona P. et al. Influence of nitric oxide during maturation on bovine oocyte meiosis and embryo development in vitro // *Reprod. Fertil. Dev.* 2008. Vol. 20. № 4. P. 529-536.
22. Sumbayev V.V., Yasinska I.M. Activities of xanthine oxidase, nitric oxide synthase, aromatase and level of cytochrome P450 1A1, 1A2 and IBI isoforms in rat upon parenteral genistein injections // *Біополімеріклітина.* 2001. Vol. 17. № 5. P. 396-400.
23. Tamanini C., Basini G., Grasselli F., Tirelli M. Nitric oxide and the ovary // *J. Endocrinol.* 2008. Vol. 199. P. 307-316.
24. Vignini A., Turi A., Giannubilo S. et al. Follicular fluid nitric oxide (NO) concentrations in stimulated cycles: the relationship to embryo grading // *Arch. Gynecol. Obstet.* 2008. Vol. 277. № 3. P. 229-232.
25. Blerkom J., Davis P., Thalhammer V. Regulation of mitochondrial polarity in mouse and human oocytes: the influence of cumulus derived nitric oxide // *Mol. Hum. Reprod.* 2008. Vol. 14. № 8. P. 443-444.

**Рецензенты:**



Матвеева Н.Ю., д.м.н., профессор, зав. кафедрой гистологии, эмбриологии и цитологии, ГБОУ ВПО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток;

Калиниченко С.Г., д.м.н., ст. научный сотрудник, ЦНИЛ ГБОУ ВПО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток.