

Я. М. Гоцуляк, Т. К. Бердієва, С.В. Ліберт

Вплив блокаторів кальцієвих каналів Т-типу на спонтанне мейотичне дозрівання оваріальних ооцитів мишей *in vitro*

Исследовано влияние блокаторов кальциевых каналов Т-типа на возобновление мейоза и спонтанное мейотическое созревание овариальных ооцитов мышей in vitro. Установлено, что увеличение эффективности угнетения созревания ооцитов блокаторами кальциевых каналов соответствует следующей последовательности: амилорида гидрохлорид, мебифрадил, никеля хлорид. Высказывается предположение об возможности создания комбинированных внутриматочных контрацептивов на основе блокаторов кальциевых каналов Т-типа.

ВСТУП

Відомо, що в період мейотичного дозрівання, запліднення гамет та раннього ембріонального розвитку важливу роль відіграють механізми кальцієвої сигналізації [3, 4, 10, 12]. Разом з тим відомості про провідне значення низькопорогових кальцієвих каналів у процесах клітинного розвитку та диференціювання [6] дозволяють висловити припущення, що саме вони відповідають за генерацію кальцієвих транзєнтів, що призводять до реалізації фізіологічної функції яйцеклітини. Існують дані, що кальцієві канали оолеми належать до Т-типу [5, 7-9]. Дослідження впливу блокаторів низькопорогових кальцієвих каналів (Т-типу) на мейотичне дозрівання досить нечисленні [1, 2]. З'ясування дії кальцієвих блокаторів Т-типу допоможе визначити адекватність використання кальцієвих блокаторів у модельних системах, а вивчення їх фармакологічної дії може бути перспективним для розробки нових контрацептивних засобів.

Метою нашої роботи було вивчити вплив специфічних блокаторів кальцієвих каналів Т-типу на відновлення і мейотичне дозрівання ооцитів миші *in vitro*.

МЕТОДИКА

Для вивчення кінцевих стадій мейозу використовували модель спонтанного дозрівання ооцитів. Досліди проводили на статевозрілих мишах лінії СВА віком від 8 до 12 тиж. Після видалення яєчників за стерильних умов під бінокулярним мікроскопом виділяли ооцити з чітким зародковим пухирцем. Ооцити з ознаками дегенеративних змін вибраковували. Всі маніпуляції з ооцитами проводились при 20 °С і в тому ж живильному середовищі, в якому передбачалося подальше культивування. Живильним середовищем було модифіковане середовище DMEM ("Sigma", США) з додаванням: 10 ммоль/л HEPES, ембріональної сироватки телят у співвідношенні до культурального середовища 1:5 та антибіотиків. Використовували блокатори кальцієвих каналів Т-типу - NiCl₂, мебифрадил та амилориду гідрохлорид ("Sigma", США) у різних концентраціях. Під час культивування через визначені проміжки часу проводили контроль динаміки мейотичного дозрівання. Після 22-годинного культивування проводився облік ооцитів різних стадій розвитку.

Результати статистично обробляли з використанням критерію t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У період оогенезу ооцити досягають стадії диплотени мейозу, після чого процес дозрівання призупиняється. Під час росту фолікулів ооцити знаходяться в стані мейотичного гальмування під дією факторів фолікулярної рідини. Штучно звільнені з антральних фолікулів ооцити мають властивість відновлювати процес дозрівання в культуральному середовищі без будь-яких гормональних стимулів. Цей феномен був використаний нами для дослідження кінцевих стадій мейозу.

Після 22-годинного культивування не менше як 95% оваріальних ооцитів контрольної групи відновлювали мейоз і досяга-

ли стадії метафази II. Морфологічним критерієм досягнення ооцитом метафази II є виділення полярного тільця. Успішне проходження клітиною стадії ініціації відновлення мейозу можна оцінити за дезінтеграцією ядерної оболонки (зникнення зародкового пухирця), що в нормі відбувається в перші чотири години культивування. Динаміку відновлення мейозу ооцитами контрольної групи наведено на рис.1,а. З діаграми видно, що в контролі кількість ініційованих до мейозу клітин експоненційно збільшується з часом. Після першої години з початку спостереження розвиток їх ініціювався у половини клітин. Утворення полярного тільця починалося з першої години культивування; кількість ооцитів з полярним тільцем набувала максимального значення на 22-гу годину спостереження.

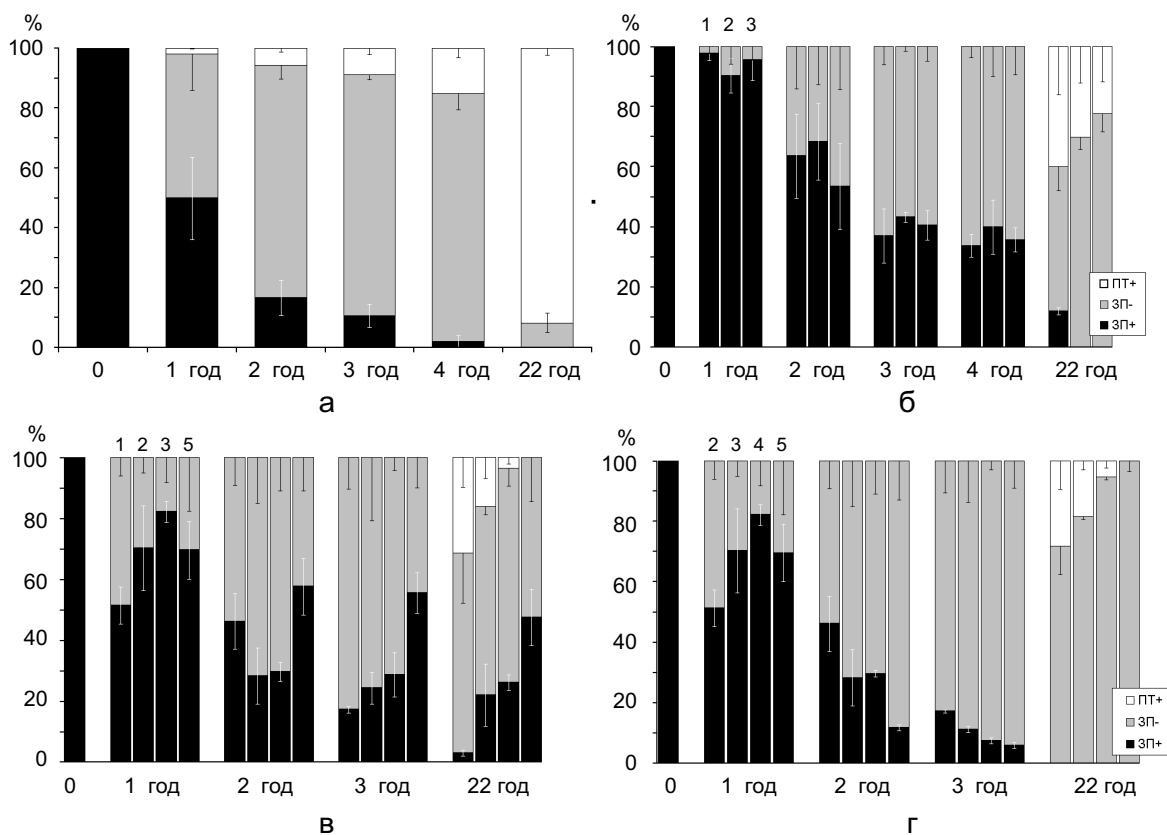


Рис. 1. Вплив блокаторів кальцієвих каналів Т-типу: нікелю хлориду (б), мефіфрадилу (в) та амілориду гідрохлориду (г) на динаміку подій мейотичного дозрівання оваріальних ооцитів *in vitro* протягом 22 год в дозах - 0,1 мкмоль/л (1), 1 мкмоль/л (2), 0,1 мкмоль/л, 10 мкмоль/л (3), 50 мкмоль/л (4) та 100 мкмоль/л (5) порівняно з контролем (а).

Узагальнюючі результати про вплив NiCl_2 на спонтанне відновлення мейотичного дозрівання ооцитів наведено на рис. 1, б. Уже в концентрації $0,01$ мкмоль/л NiCl_2 викликав пригнічення мейотичного дозрівання, і лише $60,0 \pm 8,0\%$ клітин досягали стадії ооцита другого порядку. Хлорид нікелю істотно уповільнював ініціацію спонтанного відновлення дозрівання ооцитів. Після першої години спостереження розвиток ініціювався тільки у $3-10\%$ (залежно від дози NiCl_2) клітин, в той час як у контролі на першій годині культивування у половини ооцитів зародковий пухирець розчинявся. Дія NiCl_2 викликала значні порушення дозрівання ооцитів. Про це свідчить той факт, що після 22 год культивування більше ніж 10% клітин не відновили мейоз і залишалися в стані мейотичного гальмування в диплотені профазі I. Підвищення концентрації блокатора значно збільшувало кількість клітин з помітними дегенеративними змінами (зернистість цитоплазми, втрата округлої форми, вакуолізація клітинного вмісту). Слід відмітити, що дія специфічного блокатора кальцієвих каналів Т-типу - NiCl_2 на дозрівання ооцитів за своїм характером істотно відрізнялася від дії інших використаних Т-блокаторів. При дії NiCl_2 у дозах 1 та 10 мкмоль/л у ооцитах спостерігалися партеногенетичноподібні зміни, ознаками яких були наявність клітинних утворень, подібних до стадій 2-х та 4-х клітинних бластомерів; симетричний поділ цитоплазми при утворенні ооцита другого порядку. Явища, які спостерігалися, можуть бути пов'язані з генопатогенною та цитотоксичною дією хлориду нікелю [11].

Результати впливу специфічного блокатора низькопорогових кальцієвих каналів амilorиду на динаміку відновлення мейотичного дозрівання оваріальних ооцитів представлено на рис. 1, г. Дія носила чітко виражений дозозалежний характер. У дозі 1 мкмоль/л амilorид майже не впливав на ініціювання процесу (розчинення зародкового пухирця), але істотно затримував мейотичний поділ (в той час як у контролі на

третьої годині культивування 10% клітин перейшли в стадію метафази II, при дії 1 мкмоль/л амilorиду жодна клітина не почала цитокінез). Більші дози Т-блокатора амilorиду (10 та 50 мкмоль/л) пригнічували також і ініціацію дозрівання ооцита. Всі дози блокатора забезпечували значне порушення дозрівання ооцитів. Незважаючи на те, що на третій годині культивування ініціювалося дозрівання від 83 до 96% клітин (залежно від дози блокатора), успішно перетворювалися в ооцит другого порядку менше ніж 30% клітин, а великі дози (100 мкмоль/л) призводили до повного інгібування цитокінезу.

Вплив мебіфрадилу, також специфічного блокатора Т-типу кальцієвих каналів, на динаміку мейотичного дозрівання продемонстровано на рис. 1, в. Порушення процесу дозрівання ооцитів при аплікації блокатора відзначалося вже в концентрації $0,1$ мкмоль/л: після 22 год культивування полярне тільце виділялося лише у 30% клітин. Дія мебіфрадилу в дозі 100 мкмоль/л призводила до блокування ініціації дозрівання у $50\% \pm 7\%$ ооцитів. Вплив мебіфрадилу на динаміку мейотичного дозрівання також чітко прослідковувався. Так, після першої години культивування при дії блокатора в концентрації $0,1$ мкмоль/л кількість ооцитів на стадії розчинення зародкового пухирця становила 30% , а в контролі на аналогічній стадії знаходилося 50% клітин. Тенденція до затримки проходження послідовності стадій мейозу зберігалася протягом усього часу культивування і посилювалася при дії більших концентрацій блокатора.

Дія використаних блокаторів відрізнялась як за інтенсивністю, так і за своїм характером. Результат порівняння дії хлориду нікелю, амilorиду та мебіфрадилу після 22 годин культивування представлено на рис. 2. За ефективністю блокуючої дії кальцієві блокатори Т-типу в порядку зменшення розташовувалися наступним чином: Ni^{2+} , мебіфрадил, амilorиду гідрохлорид.

Мембрана гамет і клітин ранніх ембріонів має потенціалзалежні кальцієві канали Т-типу, що беруть участь у формуванні збуд-

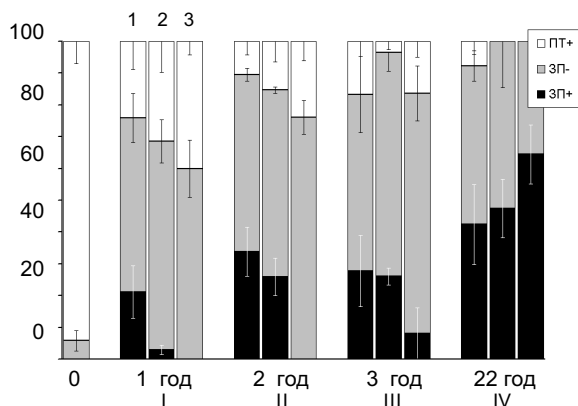


Рис. 1. Порівняння ефективності блокуючої дії нікелю хлориду (1), мебіфрадилу (2) та амilorиду гідрохлориду (3) на динаміку подій мейотичного дозрівання овариальних ооцитів *in vitro* в дозах - 0,1 мкмоль/л (I), 1 мкмоль/л (II), 10 мкмоль/л (III) та 100 мкмоль/л (VI).

ливості ооцитів і відіграють важливу функціональну роль у процесі відновлення і продовження їх мейотичного дозрівання, запліднення, а також подальшого розвитку зиготи. Блокування кальцієвої провідності може перешкоджати перебігу зазначених процесів. Це створює досить суттєві передумови для можливої розробки комбінованих внутрішньоматкових контрацептивних засобів. Антифертильні ефекти таких агентів можуть проявлятися як на різних стадіях дозрівання і взаємодії гамет, так і у перебігу розвитку зигот та їх імплантації.

**Y. M. Gotsulyak, T. K. Berdyeva,
C. V. Libert**

EFFECTS OF BLOCKERS OF THE T-TYPE Ca^{2+} CHANNELS ON SPONTANEOUS MEIOTIC MATURATION OF MURINE OVARIAL OOCYTES IN VITRO

We studied the effects of blockers of the T-type Ca^{2+} channels on resumption of meiosis and spontaneous meiotic maturation of murine ovarian oocytes *in vitro*. We found that the efficiency of suppression of oocyte maturation by blockers of the Ca^{2+} channels increases in the following succession: amiloride hydrochloride, mebifradil, $NiCl_2$. It is supposed that there is a

possibility to use blockers of the T-type Ca^{2+} channels for creation of new combined intrauterine contraceptives.

*A.A. Bogomoletz Institute of Physiology
National Academy of Science of Ukraine, Kiev*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Вознесенська Т. Ю., Алексеєва І. М. Участь кальцієвих каналів Т-типу у формуванні першого полярного тільця ооцитами мишей // *Нейрофізіологія/Neurophysiology.* - 2000. - **32**, № 3, - С. 190-191.
2. Gotsulyak Ya. M., Libert S. V., Berdyeva T. K., Gajova L. F. From mechanism of immune infertility to new contraceptive means. В кн.: *Матеріали III Нац. Конгресу патофізіологів України з міжнародною участю, (29-31 травня 2000 р. Одеса) // Фізіол. - журн. - 2000. - 46, № 2. - С. 74-75.*
3. Homa S.T. Calcium and meiotic maturation of the mammalian oocyte // *Mol. Reprod. Dev.* - 1995. - **40**, № 1.-P. 122-134.
4. Homa S.T., Carroll J., Swann K. The role of calcium in mammalian oocyte maturation and egg activation // *Hum. Reprod.* - 1993. - **8**, № 8.- P. 1274-1281.
5. Hong S. G., Han J.H., Kwun J.K., Peres A. Inactivation property of the Ca channel in mouse egg // *J. Physiol.* - 1991. - **446**. - P. 304P
6. Kostyuk P.G. Low-voltage activated calcium channels: achievements and problems // *Neuroscience.* - 1999. - **92**, № 4.- P. 1157-1163.
7. Peres A. Resting membrane potential and inward current properties of mouse ovarian oocytes and eggs // *Pflug. Arch.* - 1986. - **407**, № 5.-P. 534-540.
8. Peres A. The calcium current of mouse egg measured in physiological calcium and temperature conditions // *J. Physiol.* - 1987. - **391**. - P. 573-588.
9. Peres A., Mostacciolo G. Single- and multi-channel currents recorded with patch electrodes in mouse eggs // *Cell Biol. Int. Rep.* - 1987. - **11**, № 6.- 487-493.
10. Sirard M.A., Richard F., Mayes M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review // *Theriogenology.* - 1998. - **49**, № 2.- P. 483-497.
11. Smith-Sonneborn J., Leibovitz B., Donathan R., Fisher G.L. Bioassay of environmental nickel dusts in a particle feeding ciliate // *Environ Mutagen.* - 1986. - **8**, № 4. P. 621-626.
12. Stricker S.A. Comparative Biology of Calcium Signaling during Fertilization and Egg Activation in Animals // *Dev. Biol.* - 1999. - **211**, № 2.- P. 157-176.

*Ин-т фізіології ім. О. О. Богомольця НАН
України, Київ*

*Матеріал надійшов
до редакції 11.01.2001*