

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН

**АКИМИШИН МАРІАННА МИКОЛАЇВНА**

УДК 636.03:577.1

**КОНЦЕНТРАЦІЯ СТАТЕВИХ ГОРМОНІВ І АКТИВНІСТЬ ЕНЗИМІВ У  
ТКАНИНАХ РЕПРОДУКТИВНИХ ОРГАНІВ ЗА СТАТЕВОГО ЦИКЛУ ТА  
ГІПОФУНКЦІЇ ЯСЧНИКІВ КОРІВ**

03.00.04 – біохімія

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата ветеринарних наук

Львів – 2018

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Інституті біології тварин Національної академії аграрних наук України.

**Науковий керівник** – доктор сільськогосподарських наук, старший науковий співробітник  
**Остапів Дмитро Дмитрович**,  
Інститут біології тварин НААН, завідувач лабораторії молекулярної біології та клінічної біохімії.

**Офіційні опоненти:** доктор ветеринарних наук, старший науковий співробітник  
**Куртяк Богдан Михайлович**,  
Львівський національний університет ветеринарної медицини ім. С. З. Гжицького Міністерства освіти і науки України, завідувач кафедри епізоотології;

доктор ветеринарних наук, професор  
**Томчук Віктор Анатолійович**,  
Національний університет біоресурсів і природокористування України МОН України, завідувач кафедри біохімії і фізіології тварин ім. академіка М. Ф. Гулого.

Захист відбудеться «22» травня 2018 р. о 10 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 35.368.01 Інституту біології тварин НААН за адресою: 79034, м. Львів, вул. В. Стуса, 38.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту біології тварин НААН за адресою: 79034, м. Львів, вул. В. Стуса, 38.

Автореферат розісланий «18» квітня 2018 р.

**Вчений секретар**  
**спеціалізованої вченої ради**

**О. І. Віщур**

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Серед порушень функціонування статевої залози корів найчастіше трапляються захворювання, які характеризуються зниженням її функції. Зокрема, у 20–75 % корів молочного стада, від загального числа хворих тварин (а в окремих випадках і від кількості тварин у стаді), діагностується гіпофункція яєчників (Захарова Т. В., 2013; Ордін Ю. М., 2016).

Зниження функціональної активності статевої залози корів спричинюють низька якість й неповноцінна годівля за високої продуктивності, запізніле осіменіння, недотримання зоогігієнічних вимог у приміщеннях для тварин і правил проведення родів, некваліфікована родова допомога, відсутність акушерської та гінекологічної диспансеризації (Яблонський В. А., 2008; Влізло В. В., Куртяк Б. М., Вудмаска І. В. зі співавт., 2015). На тлі вказаних чинників порушуються ендокринний і метаболічний профілі організму, здатність структур яєчника продукувати стероїдні гормони, гальмуються розвиток ооцитів та овуляція (Cheong S. H. et al., 2016).

За гіпофункції яєчників, поряд зі зміною морфологічних їх характеристик (Бабань О. А. зі співавт., 2009), знижується інтенсивність окисно-відновних процесів у тканинах статевої і надниркових залоз та матки, дихальна активність мітохондрій, утворюються активні форми Оксигену і нагромаджуються продукти вільнорадикального окиснення (Кротких М. О., 2001; Мельничук Д. О., Грищенко В. А., Томчук В. А. зі співавт., 2014). Наслідком порушення обмінних процесів у яєчниках і, загалом, у репродуктивних органах, є гальмування відтворювальної здатності корів, недоотримання потомства та зниження продуктивності.

Тому актуальним є дослідження особливостей обмінних процесів у організмі і, зокрема, в репродуктивних органах корів за перебігу статевого циклу та виявлення їх відмінностей за гіпофункції яєчника з метою з'ясувати механізми розвитку патології й розробити спосіб нормалізації відтворної функції самиць.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота є частиною науково-дослідних робіт Інституту біології тварин НААН «Вивчити кисеньзалежні процеси в окремих тканинах організму тварин при функціональних порушеннях і розробити способи їх корекції» (№ ДР 0106U003048) та «Вивчити біотехнологічні аспекти й механізми синтезу статевих гормонів клітинами гранульози та теоретично обґрунтувати створення нових ветеринарних препаратів» (№ ДР 0111U006151) за виконання яких дисертантка провела експериментальні дослідження, проаналізувала та узагальнила отримані дані стосовно фізіолого-біохімічних процесів в організмі і репродуктивних органах корів за перебігу статевого циклу та гіпофункції яєчника, отримала і апробувала ефективність дії сировини для прототипу препарату зі стимулювання репродуктивної функції самиць.

**Мета і завдання дослідження.** Мета роботи полягала у визначенні концентрації гонадотропних і стероїдних гормонів, активності ензимів і вмісту розчинних протеїнів у тканинах репродуктивних органів корів за статевого циклу та

гіпофункції яєчників й розробленні та оцінюванні способу нормалізації відтворної функції самиць.

Для досягнення мети вирішували завдання:

- визначити концентрацію гонадотропних і стероїдних гормонів у крові й тканинах репродуктивних органів корів за перебігу статевого циклу та гіпофункції яєчників;
- дослідити активність і вміст ізозимів окремих ензимів енергетичного обміну й антиоксидантного захисту тканин;
- визначити вміст розчинних протеїнів у тканинах репродуктивних органів корів у зв'язку з перебігом статевого циклу та гіпофункцією яєчників;
- виявити кореляції між активністю окремих ензимів енергетичного обміну й антиоксидантного захисту та концентрацію гонадотропних і стероїдних гормонів у тканинах;
- з'ясувати можливість отримання сировини з гормональною активністю з антральної рідини фолікулів корів для стимулювання відтворної функції самиць;
- оцінити ефективність дії сировини з гормональною активністю на організм та репродуктивні органи самиць мишей і щурів, відтворну функцію корів.

*Об'єкт дослідження:* гормональний стан та інтенсивність обмінних процесів у репродуктивних органах корів за статевого циклу та гіпофункції яєчників, способи нормалізації репродуктивної функції самиць.

*Предмет дослідження:* концентрації фолікулостимулюючого і лютеїнізуючого гормонів, естрадіолу, прогестерону й тестостерону, активність і вміст ізозимів лактатдегідрогенази, малатдегідрогенази, супероксиддисмутази, каталази, глутатіонпероксидази, вміст і спектр розчинних протеїнів.

*Методи дослідження:* біохімічні (спектрофотометричний: визначення вмісту загального протеїну і активності ензимів; електрофоретичні: встановлення спектру протеїнів та ізозимів ензимів; імуноферментний: визначення концентрацій гормонів гонадотропних і стероїдних гормонів), фізіологічні (оцінювання стану організму корів і яєчників, розміру фолікулів), гістологічний і мікроскопічний (оцінювання і підтвердження стану репродуктивних органів самиць), статистичні (метод варіаційної статистики з використанням t-критерію Стьюдента і кореляційного відношення).

**Наукова новизна отриманих результатів.** Вперше проведено комплексні дослідження енергетичних і окисних процесів у статевій залозі, ендометрії й антральній рідині фолікулів за статевого циклу та гіпофункції яєчника корів. Доведено, що гонадотропні та стероїдні гормони регулюють активність лактат- і малатдегідрогеназ, аспартатамінотрансферази, ензимів антиоксидантного захисту в тканинах яєчника і ендометрію. Виявлено, що активність і вміст ізозимів ензимів залежать від досліджуваної тканини й стану репродуктивної системи корів. Аналогічно вміст розчинних протеїнів та їх фракцій у тканинах яєчника, ендометрію і антральній рідині характеризує стадію статевого циклу в корів і визначається інтенсивністю біохімічних процесів у репродуктивних органах та концентрацією гормонів. Вперше, на основі кореляцій між досліджуваними показниками, встановлено відмінність впливу концентрацій гормонів у тканинах

репродуктивних органів і антральній рідині на величини активності ензимів, порівняно з плазмою крові. Доведено, що антральну рідину фолікулів яєчників корів доцільно використовувати як джерело природних стероїдних гормонів та біологічно активних речовин для стимулювання відтворної функції самиць. Запропоновано спосіб отримання сировини для прототипу препарату зі стимулювання репродуктивної функції корів. Результати експериментальних досліджень забезпечили отримання й апробування ефективності дії сировини з гормональною активністю на самках лабораторних тварин і коровах. Новизна отриманих результатів підтверджена патентом на спосіб отримання естрогенів *in vitro* (патент на корисну модель № у 201010103).

**Практичне значення отриманих результатів.** Доведено, що середовище культивування 14–32 добової культури клітин антральної рідини фолікулів яєчників корів може бути сировиною для виготовлення ветеринарного препарату зі стимулювання відтворної функції самиць. Введення 0,1 мл середовища культивування самкам лабораторних тварин забезпечує збільшення маси репродуктивних органів, кількості й розміру антральних фолікулів у статевих залозах упродовж 3 діб досліджень за підвищених концентрацій гонадотропних і стероїдних гормонів у плазмі крові. Внутрішньом'язове введення двічі з інтервалом 11 діб 20,0 мл сировини для виготовлення ветеринарного препарату зі стимулювання відтворної функції корів з гіпофункцією яєчників відновлює статевий цикл в 60,0 % тварин.

Основні положення дисертаційної роботи впроваджені у навчальний процес Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького з дисципліни «Акушерство, гінекологія, біотехнологія».

**Особистий внесок здобувача.** Автором самостійно проведено аналіз літературних даних за темою дисертаційної роботи, експериментальні дослідження і статистичний аналіз цифрових даних. Планування експериментальних робіт, інтерпретація результатів досліджень, формулювання висновків здійснені за участі наукового керівника.

**Апробація результатів дисертації.** Результати досліджень дисертаційної роботи оприлюднені на міжнародних і всеукраїнських науково-практичних конференціях: «Актуальні проблеми біології, тваринництва та ветеринарної медицини» (Львів, 2009, 2014, 2015); XXVI World Buiatrics Congress (Santiago, Chile, 2010); «Молоді вчені у вирішенні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини» (Львів, 2013, 2014); XXV Jubilee International Congress of the Hungarian Association for Buiatrics (Budapest, Hungary, 2015).

**Публікації.** За результатами дисертаційної роботи опубліковано 14 наукових праць, у тому числі 11 статей у фахових наукових виданнях, з яких 9 включені до міжнародних наукометричних баз даних: 3 – у журналах, 4 – у вісниках, 3 – у науково-технічному бюлетені, стаття у закордонному журналі та збірнику наукових праць, теза доповіді на науковій конференції і патент на корисну модель.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертаційна робота викладена на 212 сторінках комп'ютерного тексту (основна частина 148 сторінок) і сформована з анотацій, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів

досліджень, аналізу й узагальнення одержаних результатів, висновків, списку використаних джерел та додатків. Робота містить 34 таблиці й 21 рисунок. Бібліографічний список налічує 293 джерела, з них 259 латиницею.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**Огляд літератури.** В огляді літератури наведено результати сучасних досліджень про особливості впливу гонадотропних і стероїдних гормонів на репродуктивну функцію, інтенсивність окисних процесів у організмі та статевих органах самиць. Висвітлена роль окремих ензимів енергетичного обміну і антиоксидантного захисту в забезпеченні відтворної функції самиць.

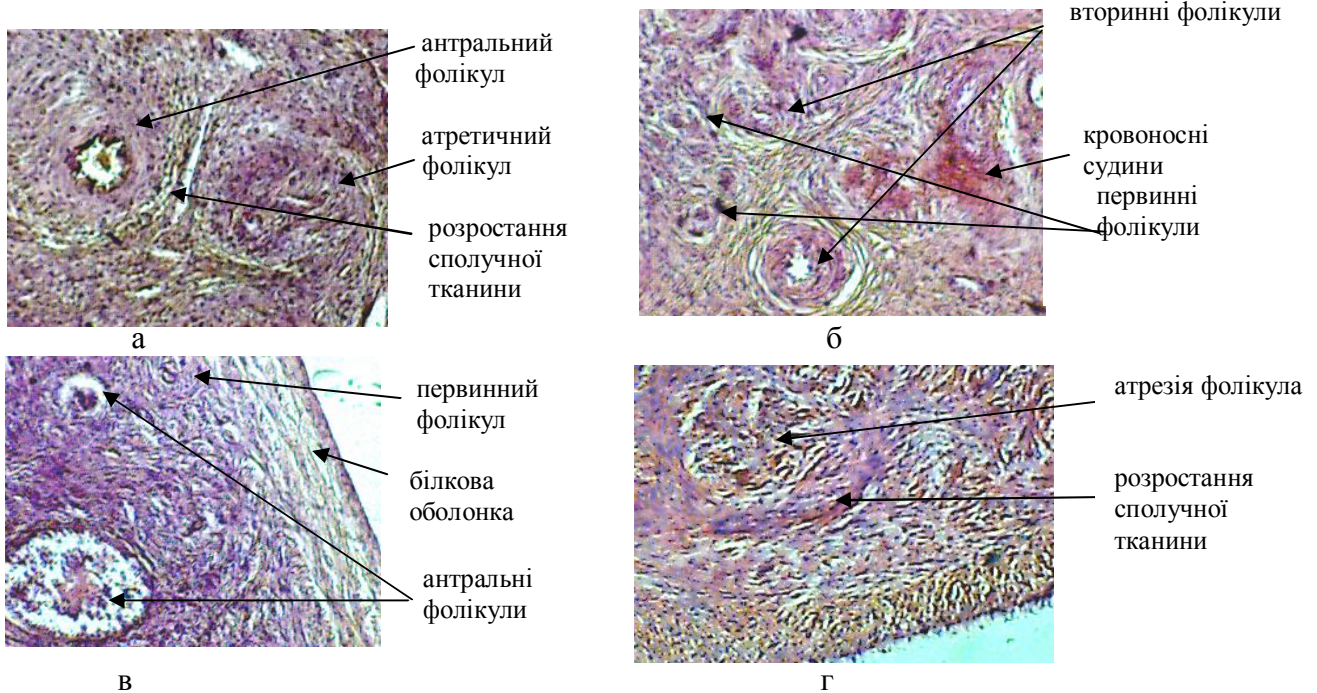
**Матеріали і методи досліджень.** Дослідження з теми дисертаційної роботи проведені впродовж 2008–2015 років у лабораторії молекулярної біології та клінічної біохімії, а також у віварії Інституту біології тварин НААН, Державному підприємстві «ДГ «Миклашів» Інституту сільського господарства Карпатського регіону НААН, м'ясопереробному підприємстві ТзОВ «Пустомитим'ясо». Для проведення досліджень із корів української чорно-рябої молочної породи ( $n = 157$ ) сформували групи тварин-аналогів за віком (5–8 років), фізіологічним станом і живою масою (450–500 кг), яких утримували за умов нормованої годівлі. У корів відбирали до забою кров з яремної вени у пробірки з гепарином, після забою – яєчники, які оцінювали візуально і за фізіологічним станом ділили на групи (Гузеватий О. Є. зі співавт., 1995): з «раннім жовтим тілом», діаметр 10–20 мм, колір червоний або брунатний ( $n = 41$ ); з «пізнім жовтим тілом», діаметр 5–15 мм, колір жовтий ( $n = 32$ ); «фолікулярного росту», без жовтого тіла ( $n = 84$ ) і, відповідно, верхню третину рогу матки. Схема досліджень наведена на рис. 1. Крім



Рис. 1. Схема досліджень

цього, відбирали статеві залози і верхню третину рогу матки у корів з порушеним

статевим циклом – гіпофункцією яєчників. Діагноз встановлювали на основі анамнезу: первинних записів техніка зі штучного осіменіння (не приходили в охоту 90 днів і більше після отелення, феномени стадії збудження статевого циклу не виявляються) та оцінюванням стану статевих залоз ректальними дослідженнями (на поверхні статевої залози фолікули не пальпуються, тканина пружна). Діагноз підтверджували дослідженнями концентрації статевих гормонів у плазмі крові, а після забою корів – гістологічними дослідженнями (рис. 2). Корів після



**Рис. 2. Мікроструктура яєчника корів: а – «раннє жовте тіло»; б – «пізнє жовте тіло»; в – «фолікулярний ріст»; г – гіпофункція яєчника (розростання сполучної тканини у фолікулярному шарі). Гематоксилін-еозин, х 100.**

ветеринарного огляду (клінічно здорові, слизові блідо-рожевого кольору, без видимих уражень) і оцінювання загального фізіологічного стану забивали на м'ясопереробному підприємстві відповідно до технологічного процесу. Для досліджень, з урахуванням стану статевої залози, відбирали тканини яєчників, ендометрію з верхньої третини рогу, антральну рідину з фолікулів діаметром до 4мм (малі), 4–7 мм (середні) і більше 7 мм (великі). Готували зразки: антральну рідину аспірували залежно від розміру фолікулів; ендометрій відпрепаровували від міометрію; тканину яєчників, після аспірації антральної рідини, промивали фізіологічним розчином за температури 2–4 °С. З тканин яєчника та ендометрію готували гомогенат: подрібнювали, промивали 0,9%-им розчином натрію хлориду, додавали 1:1 (маса : об'єм) охолоджений до 4 °С 0,25М розчин сахарози і гомогенізували в гомогенізаторі Поттера. Отриманий гомогенат центрифугували за 3000 об./хв. Відбирали надосадову рідину для досліджень біохімічних показників: вмісту і спектру розчинних протеїнів, активності та вмісту ізозимів лактатдегідрогенази (ЛДГ), малат-аспартатного шунта, ензимів антиоксидантного захисту (ЕАЗ), концентрації гормонів: фолікулостимулюючого (ФСГ),

лютеїнізуючого (ЛГ), естрадіолу (Е2), прогестерону (П), тестостерону (Т). Визначали: вміст загального протеїну в плазмі крові – біуретовим реактивом (г/л), а в гомогенатах чи антральній рідині методом Лоурі (мг/мл гомогенату чи антральної рідини), якісний і кількісний вміст фракцій розчинних протеїнів у пластинах 7,5% поліакриламідного гелю (ПААГ); активність ензимів: лактатдегідрогенази (ЛДГ; К.Ф. 1.1.1.27) і малатдегідрогенази (МДГ; КФ 1.1.1.37; мкмоль/хв×мг протеїну) за швидкістю окиснення НАДН (Кочетов Г. А., 1980); аспаратамінотрансферази (АСТ; КФ 2.6.1.1; мкмоль/хв×мг протеїну) з динітрофенілгідразином (Reitmann S., Frankel S., 1957), супероксиддисмутази (СОД; КФ 1.15. 1. 1; МО/мг протеїну) за кількістю утвореного нітроформазану (Чевари С. Н., 1991), глутатіонпероксидази (ГПО; КФ 1.11.1.9; мкмоль/хв×мг протеїну) з реактивом Елмана (Моин В. М., 1986), каталази (КАТ; КФ 1.11.1.6; ммоль/хв×мг протеїну) з молібдатом амонію (Королюк М. А., 1991). Після електрофорезу в 7,5% ПААГ специфічним фарбуванням виявляли ізозими: ЛДГ і МДГ (Garbus J., 1971 та Гааль Э., 1982), АСТ (Alfano J., Kahn M., 1993 та В. В. Влізло зі співавт., 2012), ГПО (Weydert C. J. et al., 2010), КАТ (Wodbury W. et al., 1971), а ізозими СОД після електрофорезу в 10% ПААГ (Beauchamp C. і Fridovich I., 1971). Концентрацію гормонів у плазмі крові, гомогенатах тканин репродуктивних органів і антральній рідині, а також у середовищі культивування клітин фолікулів яєчників корів визначали імуноферментним методом на аналізаторі Stat Fax 3000 та набором реактивів фірми DRG згідно з інструкцією використання тест-систем.

Для оцінювання придатності антральної рідини, як сировини для створення прототипу препарату зі стимулювання репродуктивної функції самиць, з великих (> 7 мм) фолікулів яєчника «фолікулярного росту» шляхом аспірації, отримували антральну рідину з клітинами гранульози, теки і кумулюсу. Центрифугували 5 хв при 2000 об./хв., супернатант відділяли, а осад клітин суспендували в середовищах відповідно до об'єму фолікулярної рідини RPMI-1640 з додаванням (в мас. %) еструсної сироватки корів 8–12 %; фолікулярної рідини – 10–12 %, гепарину (5 тис. од.) – 0,0010–0,0015 мл. Отриману суспензію клітин вносили у планшети (діаметр лунок 3 см) і культивували протягом 60 діб у герметично закритому ексікаторі за 5,0% CO<sub>2</sub>, 100 % вологості і температурі 38,5 °С. Через кожних 7 діб проводили заміну 2/3 середовища. У культурі клітин при постановці, через 2–3, 7–8, 14–16, 30–32 та 60 діб культивування, визначали концентрацію стероїдних гормонів.

Дію середовища культивування клітин антральної рідини, як компонента препарату зі стимулювання відтворної функції, оцінювали на статевонезрілих самицях білих безпородних мишей і щурів, яким вводили внутрішньом'язово: контрольній – 0,1 мл середовища культивування (RPMI-1640) та дослідній – 0,1 мл препарату (середовище культивування клітин). Самиць мишей декапітували через 3 доби, а щурів – через 1, 2 й 3 доби від початку досліджень. Визначали в плазмі крові концентрацію гормонів (ФСГ, ЛГ, Е2, П та Т), а в репродуктивних органах – масу матки з яєчниками і гістоструктуру матки.

Клінічне випробування ефективності дії сировини для виготовлення препарату зі стимулювання відтворної функції самиць (розчин для ін'єкцій) проводили на коровах-аналогах за живою масою і продуктивністю (n = 20), які за



аналізом первинних записів техніка зі штучного осіменіння не приходили в охоту більше 90 діб, а ректальними дослідженнями встановлена гіпофункція яєчників. Із відібраних корів сформували дві групи – дослідну (10 голів) і контрольну (порівняння; 10 голів). Коровам контрольної групи вводили внутрішньом'язово 2 мл Естрофану (препарат порівняння), а тваринам дослідної групи застосовували 20 мл сировини для виготовлення препарату зі стимулювання відтворної функції (досліджуваний препарат). За відсутності ознак феноменів стадії збудження статевого циклу (тічки, загального збудження і статевої охоти) повторно вводили досліджуваний препарат на 11-ту добу після першої ін'єкції. Проводили штучне осіменіння корів і через 3 місяці діагностували тільність за відсутністю ознак стадії збудження статевого циклу, а у сумнівних випадках – ректальним дослідженням.

Експерименти з тваринами проводили згідно вимог Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин (Strasbourg: Council of Europe 18.03.1986) та Закону України "Про захист тварин від жорстокого поводження" від 21.02.2006 р., що підтверджено протоколом (№ 65 від 08.11.2017 р.) комісії з біоетичної експертизи.

Статистичний аналіз отриманих результатів проведено методом варіаційної статистики з використанням t-критерію Стьюдента та  $\eta$  – кореляційного відношення (Плохинский Н. А., 1970) і персонального комп'ютера з програмним забезпеченням Clipper. Різницю між середніми арифметичними значеннями вважали статистично вірогідною: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

**Концентрація гормонів у крові та репродуктивних органах корів.** Зі зміною фізіологічного стану яєчника: «раннє жовте тіло» → «пізнє жовте тіло» → «фолікулярний ріст» у плазмі крові підвищуються концентрації гормонів – фолікулостимулюючого (ФСГ) й тестостерону (Т) і знижується – прогестерону (П), а максимальні величини значень лютеїнізуючого гормону (ЛГ) й естрадіолу (Е2) виявляються, відповідно, за «пізнього жовтого тіла» і «фолікулярного росту» (табл. 1). За гіпофункції яєчника корів величини значень ФСГ, Т і Е2 на рівні, а ЛГ

Таблиця 1

### Концентрації гормонів у плазмі крові корів за стану яєчника

Гормон	Стан яєчника:							
	«раннього жовтого тіла»		«пізнього жовтого тіла»		«фолікулярного росту»		гіпофункції	
	n	M±m	n	M±m	n	M±m	n	M±m
ФСГ, МО/л	3	0,7±0,12	4	0,5±0,06	5	1,6±0,25**	4	0,9±0,11*
ЛГ, МО/л	3	1,9±0,17*	4	2,4±0,38**	5	1,7±0,41	3	1,2±0,21
Е2, пг/мл	3	59,4±9,10	4	45,4±6,05	5	55,9±6,05	4	46,2±7,50
П, нг/мл	3	62,0±8,17	4	57,1±4,39*	5	53,1±5,73	3	35,1±7,43
Т, нг/мл	3	0,2±0,03	4	0,3±0,07	5	0,5±0,18	4	0,3±0,04

\*Примітка. В цій і наступній таблиці різниця статистично вірогідна порівняно з мінімальним значенням \* —  $p < 0,05$ ; \*\* —  $p < 0,01$ ; \*\*\* —  $p < 0,001$

і П – нижчі фізіологічних, проте, порівняно з «фолікулярним ростом» концентрації

всіх досліджених гормонів понижені.

У тканині статевої залози залежно від її фізіологічного стану концентрація гормонів змінюється неоднозначно: ФСГ – не залежить від стану яєчника, ЛГ – висока за «фолікулярного росту», Т і Е2 – максимальна, відповідно, за «раннього» та «пізнього жовтого тіла», а П – проявляє тенденцію до зростання: «раннє» → «пізнє жовте тіло» → «фолікулярний ріст» (табл. 2). У тканині статевої залози за

Таблиця 2

**Концентрація гормонів у тканинах репродуктивних органів корів**

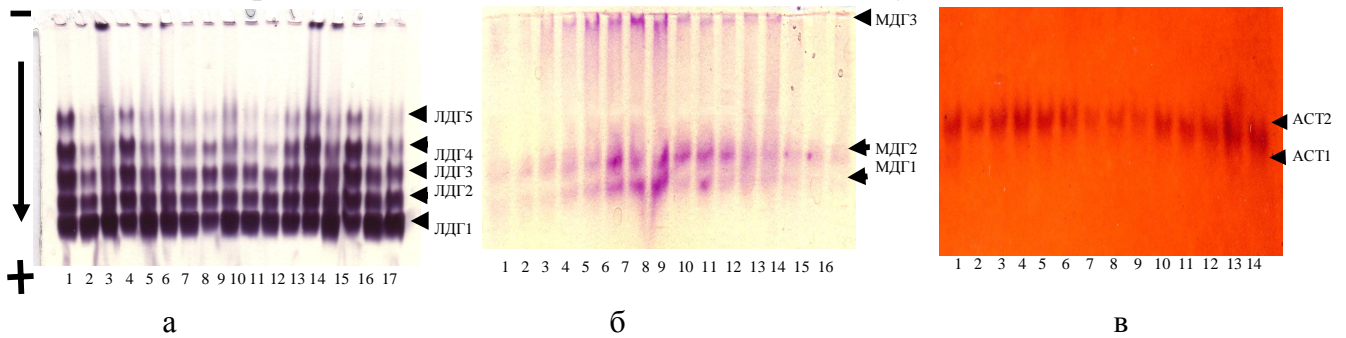
Гормон	«раннього жовтого тіла»		«пізнього жовтого тіла»		«фолікулярного росту»		гіпофункції	
	n	M±m	n	M±m	n	M±m	n	M±m
<b>Яєчника</b>								
ФСГ, МО/л	19	0,5±0,09	15	0,5±0,08	27	0,6±0,06	10	0,6±0,13
ЛГ, МО/л	56	1,3±0,09**	49	1,0±0,07	79	2,6±0,28***	13	1,4±0,17*
Е2, пг/мл	56	20,4±2,25	48	25,4±3,92	79	17,8±1,16	13	16,1±3,65
П, нг/мл	56	36,8±5,31	49	38,9±6,54	79	41,2±4,55	13	38,3±8,30
Т, нг/мл	56	37,4±1,69***	47	25,2±2,70	79	35,2±1,41***	13	18,0±3,38
<b>Ендоетрію</b>								
ФСГ, МО/л	3	0,2±0,05	8	0,7±0,16*	10	0,4±0,09	7	0,9±0,14**
ЛГ, МО/л	13	3,1±0,78	11	3,6±1,01	13	1,8±0,24	8	3,1±1,06
Е2, пг/мл	21	7,6±0,72**	14	13,2±1,85***	22	4,6±0,74	8	7,5±1,24
П, нг/мл	21	56,9±6,65***	14	10,3±1,37	23	91,2±10,37***	8	11,0±2,02
Т, нг/мл	19	43,4±5,18	14	41,6±1,39*	23	30,6±4,63	8	37,7±3,10

гіпофункції яєчника корів – низька концентрація Е2 і Т. В ендометрії концентрація ЛГ висока за стану статевої залози «пізнього жовтого тіла», Т – знижується: «раннє» → «пізнє жовте тіло» → «фолікулярний ріст», Е2 і П – вища, відповідно, за «пізнього жовтого тіла» та «фолікулярного росту», а за гіпофункції яєчника – максимальна концентрація ФСГ та знижена – П, а Т і Е2 вірогідно не відрізняються від величин фізіологічних значень.

В антральній рідині концентрація гормонів залежить як від розміру фолікулів, з яких вона вилучена, так і фізіологічного стану яєчника. Концентрація ФСГ висока у фолікулі до 7 мм (0,4–0,7 МО/л, незалежно від фізіологічного стану); за зміни «раннє» → «пізнє жовте тіло» → «фолікулярний ріст» до 7 мм ЛГ підвищується на 0,1 МО/л, а за більше 4 мм зростають Т, Е2 і П ( $p < 0,01 - 0,001$ ). В антральній рідині фолікулів яєчника за гіпофункції концентрація досліджених гормонів знижена ( $p < 0,05 - 0,01$ ).

**Активність лактатдегідрогенази та ензимів трансамінування і вміст їх ізозимів в репродуктивних органах та антральній рідині фолікулів яєчників корів.** У тканинах репродуктивних органів і антральній рідині фолікулів яєчників корів виявляється активність ЛДГ, МДГ і АСТ. Активність ензимів забезпечується ізозимами ЛДГ: ЛДГ1, ЛДГ2, ЛДГ3, ЛДГ4 і ЛДГ5; АСТ: АСТ1 і АСТ2; МДГ: МДГ1,

МДГ2 і МДГ3 (рис. 3). Більша частина активності ЛДГ у тканинах яєчника і

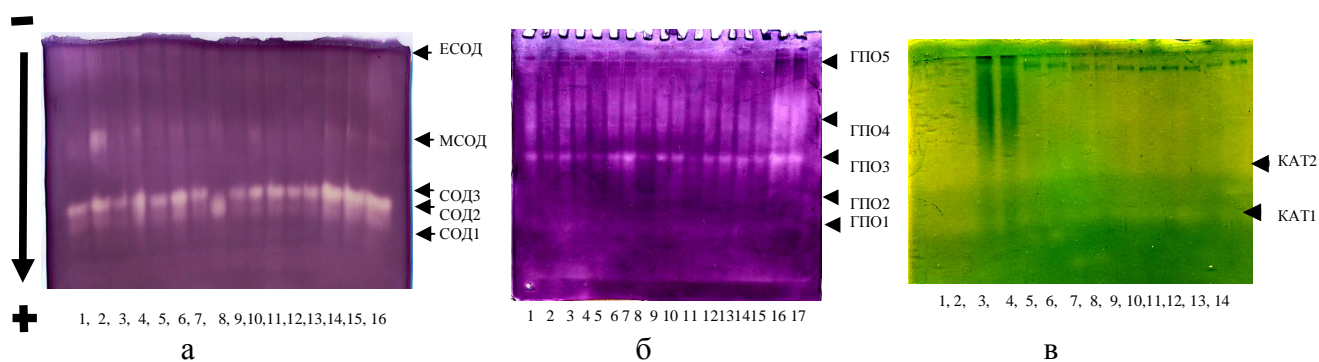


**Рис. 3. Ізозими ЛДГ та малат-аспартатного шунта у тканинах репродуктивних органів корів: а – ЛДГ; б - МДГ; в – АСТ.**

ендометрію та антральній рідині забезпечується ЛДГ1 (29,7–67,7 %), МДГ – МДГ1 і МДГ2 (18,9–60,9 %), а АСТ: у тканинах більше АСТ2 (78,8–97,7 %), а у антральній рідині АСТ1 (72,8–8,2 %). Перебіг статевого циклу (зміни фізіологічного стану яєчників: «раннє» → «пізнє жовте тіло» → «фолікулярний ріст») характеризується різною інтенсивністю обмінних процесів у тканинах репродуктивних органів. За послідовної зміни стану яєчників зростає активність ЛДГ у статевій залозі та ендометрії ( $p < 0,05-0,01$ ). При цьому в ендометрії за «фолікулярного росту», порівняно з іншими станами яєчника, знижується ( $p < 0,05-0,001$ ) вміст ЛДГ4 та ЛДГ5. Активність АСТ підвищена в тканинах яєчника та ендометрію за «пізнього жовтого тіла» й становить відповідно  $132,0 \pm 8,23$  і  $172,9 \pm 8,70$  мкмоль/хв×мг протеїну, а за «фолікулярного росту» вміст АСТ2 – високий (92,2–97,7 %) і максимальна активність МДГ (1,0–1,1 нмоль/хв×мг протеїну). За гіпофункції яєчника у тканинах репродуктивних органів активність і вміст ізозимів ЛДГ на рівні величин значень за фізіологічних станів та низькі АСТ і МДГ ( $p < 0,05-0,001$ ) зі зниженим умістом МДГ2 і вищим МДГ3 ( $p < 0,05$ ).

У антральній рідині активність ЛДГ низька з великих фолікулів залоз «фолікулярного росту» та «раннього жовтого тіла» ( $1,4-1,5$  мкмоль/хв×мг протеїну) і висока – з «пізнього жовтого тіла» ( $2,2 \pm 0,88$  мкмоль/хв×мг протеїну). В антральній рідині з фолікулів менше 4 мм яєчника «пізнього жовтого тіла» та «фолікулярного росту» відповідно високу активність АСТ ( $88,1 \pm 5,02$  мкмоль/хв×мг протеїну) і МДГ ( $1,6 \pm 0,46$  нмоль/хв×мг протеїну) і, навпаки, з більше 7 мм – вищий уміст АСТ1 ( $86,5 \pm 1,53$  %) і МДГ2 ( $56,1 \pm 6,83$  %) та МДГ3 ( $41,8 \pm 7,06$  %). За гіпофункції яєчника для антральної рідини характерні активності: низька ЛДГ ( $0,5 \pm 0,09$  мкмоль/хв×мг протеїну) з найвищим вмістом ЛДГ5 ( $p < 0,05-0,01$ ) і висока АСТ ( $99,0 \pm 5,12$  мкмоль/хв×мг протеїну;  $p < 0,001$ ), а МДГ – на рівні величин за фізіологічних станів статевої залози.

**Активність та вміст ізозимів ензимів антиоксидантного захисту в репродуктивних органах і антральній рідині фолікулів яєчників корів.** У тканинах репродуктивних органів і антральній рідині фолікулів яєчників корів встановлена активність ензимів антиоксидантного захисту (ЕАЗ). Ензими, за розділення в електричному полі, проявляються ізозимами: по 5 смуг каталітично активних протеїнів СОД і ГПО та 2 – КАТ (рис. 4). Основну частину активності



**Рис. 4. Ізозими ензимів антиоксидантного захисту тканин яєчника і ендометрію корів: а – СОД ; б – ГПО; в – КАТ.**

ЕАЗ в тканинах і антральній рідині забезпечують відповідно СОД2 (38,0–58,4 %), ГПО3 (38,0–74,8 %) і КАТ2 (74,4–88,7 %), а на інші ізозими припадає 4,3–19,9 %. Активність СОД зі зміною фізіологічного стану «раннє» → «пізнє жовте тіло» → «фолікулярний ріст» у тканині яєчника знижується ( $p < 0,001$ ), а КАТ – найменша ( $1,11 \pm 0,05$  ммоль/хв×мг протеїну;  $p < 0,01$ ) за «пізнього жовтого тіла».

У ендометрії не встановлено вірогідної різниці між активністю ЕАЗ залежно від фізіологічного стану яєчника, як і вмісту ізозимів СОД і КАТ в обох тканинах. Також не виявлено відмінностей активності ГПО в тканині яєчника і ендометрію за фізіологічних станів статевої залози. Однак у тканині статевої залози за «раннього жовтого тіла» встановлено зниження ГПО1 ( $p < 0,01$ ), а за «пізнього жовтого тіла» – підвищення ГПО4 ( $p < 0,05–0,01$ ). У ендометрії вищий ( $p < 0,01$ ) вміст ГПО1 і ГПО2 за стану яєчника «раннього жовтого тіла», а ГПО3 – за «фолікулярного росту».

За гіпофункції для тканини яєчника характерна: найнижча активність ЕАЗ і низький вміст ізозимів СОД2, ГПО1, ГПО4 та ГПО5 ( $p < 0,01$ ), підвищений СОД3, ЕСОД та ГПО3 ( $p < 0,05–0,01$ ), а в ендометрії – понижений вміст СОД2, ГПО1 і КАТ1 й високі активності ГПО ( $0,04 \pm 0,004$  мкмоль/хв×мг протеїну) і КАТ ( $0,74 \pm 0,05$  ммоль/хв×мг протеїну) та вміст СОД3, МСОД, ЕСОД, ГПО5 і КАТ2, порівняно з величинами значень за фізіологічних станів.

Активність ЕАЗ у антральній рідині залежить від розміру фолікула та фізіологічного стану яєчника. Висока активність СОД характерна для фолікулів: великих – яєчників «фолікулярного росту» ( $20,1 \pm 4,72$  МО/мг протеїну) і «раннього жовтого тіла» ( $22,8 \pm 6,30$  МО/мг протеїну), малих – «пізнього жовтого тіла» ( $36,2 \pm 7,81$  МО/мг протеїну). При цьому зі збільшенням розміру фолікулів статевих залоз «фолікулярного росту» й «раннього жовтого тіла» проявляється тенденція до підвищення активності КАТ (12,7–35,8 %), а з фолікулів 4–7 мм «пізнього жовтого тіла», навпаки, до зниження (15,0–24,0 %). Не виявлено вірогідної різниці між вмістом ізозимів СОД і КАТ антральної рідини з фолікулів різного діаметра одного і того ж фізіологічного стану статевої залози. Однак існує вірогідна різниця ( $p < 0,05$ ) вмісту окремих ізозимів СОД у фолікулах однакового діаметра, але з різних за фізіологічним станом статевих залоз.

Активність ГПО висока в антральній рідині фолікулів яєчника «пізнього жовтого тіла» ( $0,20–0,38$  мкмоль/хв×мг протеїну). При цьому за «раннього» і

«пізнього жовтого тіла» зі збільшенням розміру фолікулів активність ензиму підвищується (26,4–41,7 %;  $p < 0,01$ ). Для антральної рідини фолікулів яєчника за гіпофункції характерні підвищена активність ЕАЗ, вищий вміст МСОД і ГПО5 ( $p < 0,05$ ) і нижчий ГПО2 ( $p < 0,05$ ).

**Вміст розчинних протеїнів у тканинах репродуктивних органів і антральній рідині фолікулів яєчників корів.** Дія гормонів і активування ензимів проявляється коливаннями вмісту загального протеїну та його фракцій у тканинах репродуктивних органів. Уміст розчинного протеїну підвищений у досліджених тканинах яєчника за стану «раннього жовтого тіла» і «фолікулярного росту» (9,5–10,4 мг/мл). При цьому зі зміною фізіологічного стану: «раннє» → «пізнє жовте тіло» → «фолікулярний ріст» у тканині яєчників на 0,8–1,1 % знижується вміст преальбумінів і на 6,0–6,5 % –  $\gamma$ -глобулінів та зростає на 2,5–3,3 % вміст альбуміну і на 0,4–0,6 % – гаптоглобінів (Нр;  $p < 0,05$ –0,01), а в ендометрії за «пізнього жовтого тіла» збільшується на 1,8–2,9 % вміст преальбумінів, на 0,6–1,2 % –  $\alpha_1$ -глобулінів і на 0,3–0,5 % – Нр. У тканині залози за гіпофункції вміст загального протеїну не відрізняється від фізіологічних величин, однак вищий вміст  $\alpha_3$ -глобулінів ( $p < 0,05$ ), а в ендометрії – підвищений вміст загального протеїну, в тому числі вміст альбуміну й  $\alpha$ -глобулінів ( $p < 0,05$ ), та знижений – преальбумінів, Нр ( $p < 0,05$ ) і  $\gamma$ -глобулінів.

У антральній рідині вміст загального протеїну найвищий з фолікулів яєчників «раннього жовтого тіла» (31,2–39,8 мг/мл) з переважанням у його складі преальбумінів і  $\gamma$ -глобулінів, а за «фолікулярного росту» зі збільшенням розміру фолікулів проявляється тенденція до зниження на 0,2–1,2 мг/мл загального протеїну за збереженого відсоткового вмісту його фракцій. За патології яєчника в антральній рідині фолікулів найнижчий вміст загального протеїну ( $11,5 \pm 2,84$  мг/мл;  $p < 0,05$ –0,01) та не відрізняється вміст фракцій, порівняно з аналогами за фізіологічних станів.

**Кореляції між концентрацією гормонів у крові та тканинах репродуктивних органів і активністю ензимів.** На основі кореляційного аналізу між гонадотропінами в плазмі крові та стероїдними гормонами в репродуктивних органах корів виявлено, що зі збільшенням ФСГ в плазмі крові у тканинах яєчника знижується концентрація Е2 та підвищується – П ( $\eta = 0,304$ –0,397), у ендометрії знижується концентрація Е2 ( $\eta = 0,434$ ), а максимум П ( $64,6 \pm 12,24$  нг/мл) виявляється за 0,5–1,0 МО/л ФСГ ( $\eta = 0,448$ ). Зі збільшенням ФСГ в плазмі крові у тканині яєчника підвищується активність ЛДГ ( $\eta = 0,495$ ) та знижуються АСТ ( $p < 0,01$ ;  $\eta = 0,468$ ), СОД і КАТ (відповідно  $\eta = 0,331$  і 0,794), а у ендометрії максимальні величини АСТ і ГПО проявляються відповідно за більше 1,0 та менше 0,5 МО/л ФСГ ( $\eta = 0,322$  і 0,353).

Підвищення ЛГ в плазмі крові характеризує збільшення в тканинах яєчника концентрацій Т ( $\eta = 0,585$ ), П ( $\eta = 0,478$ ) та Е2 ( $\eta = 0,540$ ); в ендометрії – підвищення П та Е2 (відповідно  $\eta = 0,435$  і 0,561) і не змінюється Т ( $\eta = 0,282$ ). Зростання ЛГ в плазмі крові характеризує у тканинах яєчника підвищення активності АСТ, ГПО і КАТ (відповідно  $\eta = 0,332$ , 0,368 і 0,580), а за 1,2–2,4 МО/л гормону проявляється максимальна активність ЛДГ ( $\eta = 0,483$ ) і низька – МДГ та

СОД (відповідно  $\eta = 0,400$  і  $0,546$ ), в ендометрію – підвищення активності ГПО ( $\eta = 0,574$ ), а за  $1,2$ – $2,4$  МО/л гормону – зниження КАТ ( $\eta = 0,435$ ).

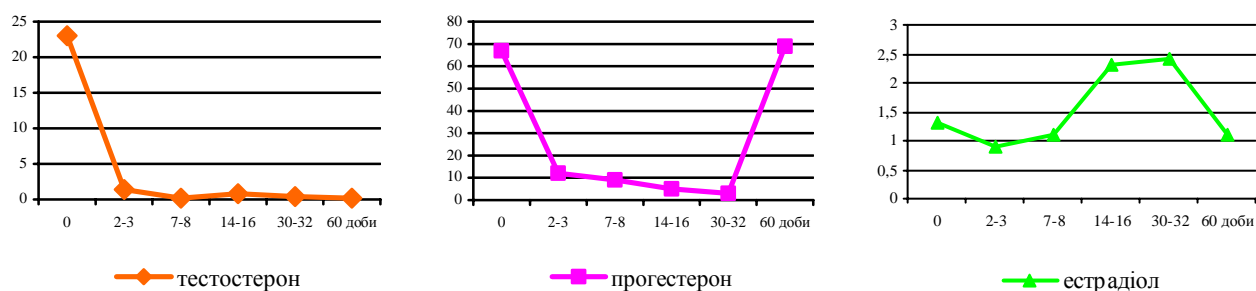
Підвищення концентрації Т в плазмі крові корів проявляється у тканині статевої залози активуванням МДГ і ГПО (відповідно  $\eta = 0,530$  і  $0,300$ ) та зниженням СОД ( $\eta = 0,423$ ), а в ендометрії – підвищенням активності ЛДГ і АСТ (відповідно  $\eta = 0,401$  і  $0,471$ ) й зниженням МДГ і СОД (відповідно  $\eta = 0,456$  і  $0,595$ ). Зростання концентрації П в плазмі крові характеризує в тканині яєчника підвищення процесів гліколізу (ЛДГ;  $\eta = 0,541$ ) і гальмування активності ГПО ( $\eta = 0,342$ ), а в ендометрії – активування МДГ ( $\eta = 0,415$ ) і АСТ ( $\eta = 0,465$ ) та зниження активності КАТ ( $\eta = 0,411$ ). Підвищення концентрації Е2 в плазмі крові негативно корелює з активністю КАТ в тканині яєчника ( $\eta = 0,426$ ), а в ендометрії низькі МДГ, АСТ і ГПО виявляються за  $45,0$ – $55,0$  пг/мл гормону (відповідно  $\eta = 0,476$ ,  $0,487$  і  $0,311$ ).

Вплив концентрацій гормонів у тканинах репродуктивних органів на досліджувані біохімічні показники відрізняється від встановлених у плазмі крові. У тканині яєчника підвищення концентрацій ФСГ і ЛГ зі слабкою силою корелює з активністю ензимів трансамінування, антиоксидантного захисту та ЛДГ (не перевищує  $\eta = 0,289$ ), а в ендометрії відповідно знижуються МДГ, АСТ і СОД ( $\eta = 0,821$ ,  $0,376$  і  $0,404$ ) і зростають ЛДГ та ГПО ( $\eta = 0,432$  і  $0,393$ ).

Аналіз кореляцій між стероїдними гормонами і активністю досліджуваних ензимів у тканинах репродуктивних органів свідчить, що за підвищення концентрації Т в тканині яєчника зростає активність СОД, ГПО і КАТ ( $\eta = 0,313$  –  $0,525$ ) та знижуються АСТ і МДГ ( $\eta = 0,327$  і  $0,422$ ). В тканині ендометрію за зростання концентрації Т підвищується активність ЛДГ ( $\eta = 0,482$ ) і знижуються СОД та КАТ ( $\eta = 0,525$  і  $0,330$ ), а мінімальна активність МДГ ( $0,5 \pm 0,23$  нмоль/хв $\times$ мг протеїну) проявляється за  $30,0$ – $45,0$  нг/мл гормону ( $\eta = 0,538$ ).

За підвищення концентрації П в тканині яєчника зростає активність МДГ ( $\eta = 0,331$ ), а за  $10$ – $20$  нг/мл гормону характерна найнижча активність ЛДГ ( $\eta = 0,311$ ). У тканині ендометрію до  $20,0$  нг/мл П знижуються активності МДГ, АСТ і СОД, а за більше  $20$  нг/мл – зростають ( $p < 0,05$ – $0,01$ ;  $\eta = 0,373$ ,  $0,341$  і  $0,494$ ). Підвищення концентрації Е2 в тканині яєчника характеризує зростання ( $p < 0,05$ – $0,001$ ) активності СОД і КАТ ( $\eta = 0,315$  і  $0,361$ ), а в ендометрії існує оптимум ( $5,0$ – $10,0$  пг/мл) гормону за якого проявляється максимальна активність ЛДГ ( $\eta = 0,366$ ) та низькі АСТ і КАТ ( $\eta = 0,449$  і  $0,677$ ).

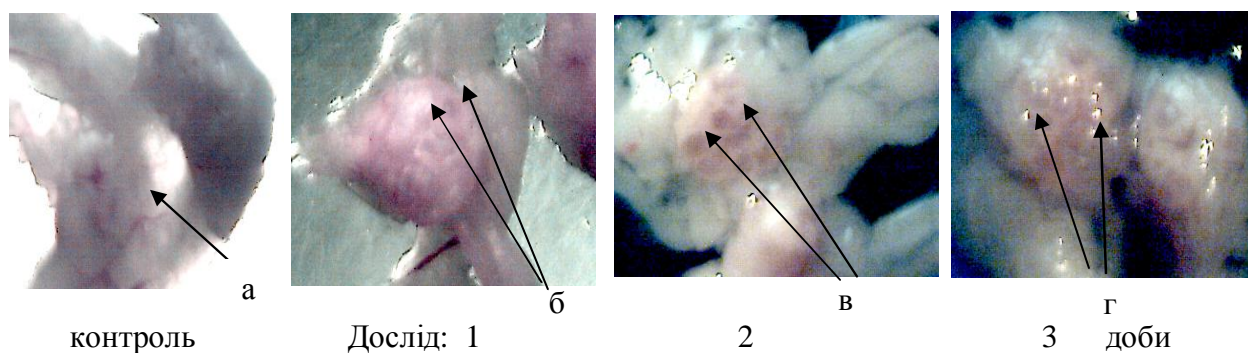
**Дослідження гормон-продукуючої здатності клітин антральної рідини фолікулів, отримання сировини для прототипу препарату зі стимулювання відтворної функції самиць та її вплив на репродуктивні органи лабораторних тварин і відновлення статевого циклу корів.** Клітини антральної рідини (теки, гранульози, кумулюсу) синтезують *in vitro* стероїдні гормони. Впродовж культивування в культурі клітин концентрація Т поступово знижується і за більше  $16$  діб коливається в межах  $0,2$ – $0,8$  нг/мл (рис. 5). Синтез Е2 на  $14$ – $16$  – добу в культурі клітин досягає майже вдвічі вищої концентрації, ніж у фолікулярній рідині, й утримується на рівні впродовж  $30$ – $32$  діб культивування, концентрація П знижується до  $14$ – $32$  доби, а на  $60$  - ту добу зростає.



**Рис. 5. Концентрація стероїдних гормонів за культивування клітин антральної рідини, нг/мл**

Апробуванням дії сировини для виготовлення препарату зі стимулювання репродуктивної функції на самках мишей доведено, що за введення 0,1 мл середовища з мінімальною дозою стероїдних гормонів (за естрадіолом 70 пг/мл) підвищується маса матки та яєчників мишей більш ніж удвічі, порівняно з контролем, за рахунок збільшення товщини стінки міометрію та ендометрію і величини маткових залоз. Вказані морфоструктурні зміни репродуктивних органів проявляються за підвищеної концентрації в плазмі крові гормонів: ФСГ – на 58,2 %, ЛГ – 28,8 % ( $p < 0,05$ ), Т – 37,3 %, П – 20,8 %, порівняно з контролем. Концентрація E2 в контрольній та дослідній групах не відрізняється і становить 39,0–42,7 пг/мл.

Оцінюванням морфологічного стану яєчників самиць шурів за введення 0,1 мл сировини виявлено впродовж 3 діб досліджень поступове збільшення числа та розміру видимих антральних фолікулів у статевих залозах (рис. 6). Ефективність



**Рис. 6. Яєчники піддослідних самиць шурів за введення сировини для виготовлення препарату зі стимулювання репродуктивної функції: а – яєчник; антральні фолікули: б – малі; в і г – великі.**

дії сировини для виготовлення препарату зі стимулювання відтворної функції самиць підтверджена відновленням статевого циклу в корів за її застосування. Після двохразового внутрішньом'язового введення дозою 20 мл/гол. (розчин для ін'єкцій) виявлено, що з 10 корів у 6 (60,0 %) відновився статевий цикл, що проявлялось ознаками феноменів стадії збудження і, після штучного осіменіння, діагностували тільність.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі узагальнено результати досліджень гормонального стану (гонадотропних і стероїдних гормонів) і активності й вмісту ізозимів лактатдегідрогенази, ензимів малат-аспартатного шунта і антиоксидантного захисту в тканинах репродуктивних органів за статевого циклу та гіпофункції яєчників корів. Теоретично обґрунтована й апробована можливість використання середовища культивування клітин антральної рідини фолікулів яєчників корів як сировини для виготовлення препарату зі стимулювання репродуктивної функції самиць.

1. У крові корів, залежно від фізіологічного стану яєчника, 0,7–1,6 МО/л ФСГ і 1,7–2,4 МО/л ЛГ, тестостерону і прогестерону 0,2–0,5 і 53,1–63,1 нг/мл відповідно та естрадіолу – 45,4–59,4 пг/мл; у тканинах репродуктивних органів (мл гомогенату): ФСГ і ЛГ відповідно 0,2–0,9 і 1,0–3,6 мМО, тестостерону та прогестерону – 18,0–43,4 і 10,3–91,2 нг та естрадіолу – 4,6–25,4 пг; антральній рідині: ФСГ і ЛГ, відповідно, 0,4–0,7 і 0,9–1,6 МО/л, тестостерону, прогестерону і естрадіолу (нг/мл) – 10,1–40,3, 6,3–92,8 і 9,2–33,0.

2. За гіпофункції яєчника, порівняно з фізіологічними станами, в плазмі крові корів концентрації ФСГ, ЛГ та прогестерону низькі ( $p < 0,05$ – $0,01$ ); в тканині статевої залози: естрадіолу і тестостерону – понижені ( $p < 0,001$ ), в ендометрії ФСГ максимальна ( $p < 0,001$ ) і прогестерону – низька ( $p < 0,001$ ), а в антральній рідині фолікулів величини значень концентрацій всіх досліджених гормонів понижені ( $p < 0,05$ – $0,001$ ).

3. Для тканин репродуктивних органів і антральної рідини за статевого циклу характерні, відповідно (хв×мг протеїну): 33,9–48,8 та 1,1–2,8 мкмоль ЛДГ, 0,6–1,0 та 0,3–1,6 нмоль МДГ, 66,5–132,0 та 35,7–88,1 мкмоль АСТ, 15,2–25,6 та 7,6–36,2 МО СОД, 0,036–0,054 та 0,035–0,38 мкмоль ГПО, 0,60–1,51 та 0,54–0,84 ммоль КАТ. За гіпофункції у тканині яєчника понижені активності ензимів антиоксидантного захисту і АСТ ( $p < 0,05$ – $0,001$ ), ендометрію – максимальна ЛДГ ( $49,6 \pm 5,44$  мкмоль/хв×мг протеїну) і низька МДГ ( $p < 0,01$ – $0,001$ ), а у антральній рідині: вищі на 50,0–61,6 % активність КАТ і вміст МСОД й ГПО5 ( $p < 0,05$ ) та нижчий – ГПО2 ( $p < 0,05$ ).

4. У тканинах репродуктивних органів і антральній рідині фолікулів яєчників корів активність ЛДГ, СОД і ГПО проявляються 5 смугами каталітично активних протеїнів, МДГ – 3, АСТ і КАТ – 2. Основна частина активності ензимів у тканинах і антральній рідині припадає на ізозими СОД2 (38,0–58,4 %), ГПО3 (38,0–74,8 %), КАТ2 (74,4–88,7 %), ЛДГ1 (29,7–67,7 %), МДГ1 і МДГ2 (18,9–60,9 %), АСТ: у тканинах більше АСТ2 (78,8 – 97,7 %), а в антральній рідині – АСТ1 (72,8–88,2 %).

5. Вміст загального протеїну в тканині яєчника зі слабкою силою корелює з фізіологічним станом статевої залози ( $\eta = 0,250$ ), а в ендометрії – з середньою ( $\eta = 0,529$ ). За гіпофункції в тканині яєчника вищий вміст  $\alpha_3$ -глобулінів ( $p < 0,05$ ), а в ендометрії вищий вміст альбуміну ( $p < 0,05$ ) та низький –  $\gamma$ -глобулінів ( $p < 0,01$ ). У антральній рідині фолікулів за гіпофункції яєчника вміст розчинних протеїнів низький ( $p < 0,05$ – $0,01$ ).

6. Концентрація гонадотропнів у крові з неоднозначною силою корелює зі



стероїдними гормонами у тканинах яєчника – ЛГ –  $\eta = 0,478 - 0,585$  і ФСГ – з естрадіолом та прогестероном ( $\eta = 0,397$  і  $0,304$ ) та у ендометрії: ЛГ – з естрадіолом і прогестероном ( $\eta = 0,561$  та  $0,435$ ) і ФСГ, відповідно,  $\eta = 0,434$  та  $0,480$ .

7. Концентрація ФСГ у крові виявляє сильний негативний зв'язок з активністю КАТ ( $\eta = 0,794$ ) у тканині яєчника, а з іншими дослідженими ензимами в тканинах за ФСГ і ЛГ – кореляція неоднозначна за напрямом середньої сили ( $\eta = 0,307-0,580$ ). Підвищення концентрації стероїдних гормонів у крові виявляє різну за напрямом середньої сили кореляцію з активністю досліджених ензимів в тканинах репродуктивних органів корів ( $\eta = 0,396-0,595$ ).

8. У тканині яєчника концентрація ФСГ і ЛГ зі слабкою силою корелюють із активністю досліджених ензимів (не перевищує  $\eta = 0,289$ ), у ендометрії – зі зростанням ФСГ знижується активність АСТ і СОД (відповідно,  $\eta = 0,376$  і  $0,404$ ), а з підвищенням ЛГ зростають ЛДГ і ГПО ( $\eta = 0,432$  і  $0,393$ ).

9. У тканині яєчника за підвищення концентрації тестостерону гальмується активність малат-аспартатного шунта ( $\eta = 0,327-0,422$ ) і активується ензиматична ланка антиоксидантного захисту ( $\eta = 0,313-0,525$ ), естрадіолу – зростає активність СОД і КАТ ( $\eta = 0,315$  і  $0,361$ ), прогестерону – знижується активність ЛДГ ( $\eta = 0,311$ ) і підвищується – МДГ ( $\eta = 0,331$ ). У ендометрії за підвищення концентрації тестостерону активується гліколіз (ЛДГ;  $\eta = 0,482$ ), гальмуються активності малат-аспартатного шунта, СОД і КАТ ( $\eta = 0,364-0,575$ ), естрадіолу – знижується активність ЛДГ, АСТ і КАТ ( $\eta = 0,366-0,677$ ), прогестерону – зростає активність малат-аспартатного шунта і СОД ( $\eta = 0,341-0,494$ ).

10. Сировина для виготовлення препарату зі стимулювання репродуктивної функції на основі середовища культивування клітин антральної рідини фолікулів яєчників корів за внутрішньом'язового введення самкам лабораторних тварин забезпечує більш ніж удвічі збільшення маси матки і статевих залоз, кількості й розміру видимих антральних фолікулів, а за гіпофункції яєчників корів у 60,0 % відновлює статевий цикл, що забезпечує після штучного осіменіння їх запліднення і тільність.

### **ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ**

1. Для отримання сировини (компоненту) з виготовлення препарату зі стимулювання репродуктивної функції самиць, слід культивувати клітини антральної рідини фолікулів корів упродовж 14–16 діб у середовищі RPMI-1640 (мас.%): клітин гранульозного шару фолікулів – 5–7 млн клітин/мл; еструсної сироватки корів 8–12; фолікулярної рідини – 10–12 %; гепарин (5 тис. од.) – 0,0005–0,0015; синтетичне середовище RPMI-1640 – до 100 %.

2. Відновлення фізіологічної активності яєчників корів забезпечується завдяки введенню дворазово, внутрішньом'язово 20 мл/гол. компонента (сировини) препарату зі стимулювання репродуктивної функції самиць, отриманого за культивування антральної рідини впродовж 14–16 діб.

**СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

1. Остапів Д. Д., **Акимішин М. М.**, Каплінський В. В., Сачко Р. Г. Білки сироватки крові корів та органів розмноження корів. Науковий вісник ЛНУВМБ ім. С. З. Гжицького. Львів, 2008. Т. 10. № 3(38). Ч. 2. С. 9–14. *(Дисертант відбирала репродуктивні органи корів, провела електрофоретичне визначення розчинних протеїнів, проаналізувала та узагальнила результати, написала статтю).*
2. **Акимішин М. М.**, Остапів Д. Д., Сачко Р. Г., Грабовська О. С., Мартин Ю. В. Зв'язок між фізіологічним станом яєчників та концентрацією естрадіолу у репродуктивних органах корів. Науковий вісник ЛНУВМБ ім. С. З. Гжицького. Львів, 2009. Т. 11. № 2 (41). Ч. 1. С. 9–14. *(Дисертант відбирала репродуктивні органи корів, визначила концентрацію естрадіолу, статистично опрацювала отримані дані, взяла участь у написанні статті).*
3. **Акимішин М. М.**, Остапів Д. Д., Мартин Ю. В., Сачко Р. Г., Грабовська О. С., Пилипець А. З. Мікроструктура матки та інтенсивність споживання кисню мітохондріями ендометрію корів. Біологія тварин. 2010. Т. 12. № 1. С. 284–289. *(Дисертант відбирала верхню третину рогу матки корів, виготовила гістозрізи і дослідила мікроструктуру, спільно зі співавторами підготувала статтю до друку).*
4. Мартин Ю. В., Пилипець А. З., Сачко Р. Г., Яремчук І. М., **Акимішин М. М.**, Кузьміна Н. В. Гістоморфологічні особливості та вміст класів ліпідів у яєчниках корів різного фізіологічного стану. Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини. Збірник наукових праць. Харків, 2011. Вип. 23 (Ч. 2). Т.1. С. 57–61. *(Дисертант відбирала яєчники корів, провела оцінювання фізіологічного стану статевих залоз, спільно зі співавторами дослідила мікроструктуру і проаналізувала результати, взяла участь у написанні статті).*
5. Мартин Ю. В., Остапів Д. Д., Сачко Р. Г., Пилипець А. З., **Акимішин М. М.** Мікроструктура яєчників великої рогатої худоби залежно від віку. Біологія тварин. 2012. Т. 14. № 1–2. С. 530–534. *(Дисертант відбирала яєчники корів, оцінила фізіологічний стан і дослідила мікроструктуру статевих залоз, проаналізувала отримані дані, спільно зі співавторами підготувала статтю до друку).*
6. **Акимішин М. М.**, Кузьміна Н. В., Сачко Р. Г., Остапів Д. Д. Активність ензимів антиоксидантного захисту в репродуктивних органах корів за норми та патології. Науковий вісник ЛНУВМБ ім. С. З. Гжицького. Львів, 2014. Т. 16. № 2. Ч. 2. С. 3–8. *(Дисертант приготувала гомогенати тканин, дослідила активність ензимів антиоксидантного захисту, спільно зі співавторами проаналізувала результати, написала статтю).*
7. Мартин Ю. В., **Акимішин М. М.**, Сачко Р. Г., Віщур В. Я., Остапів Д. Д. Гістоморфологічна характеристика та концентрація гормонів тканини яєчника корів і телиць залежно від фізіологічного стану. Інституту біології тварин та НТБ ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок. Львів, 2014. Вип. 15. № 2,3. С. 190–196. *(Дисертант визначила концентрації статевих гормонів у гомогенатах тканин яєчника і ендометрію, спільно зі співавторами проаналізувала результати, взяла участь у написанні статті).*
8. **Акимішин М. М.**, Остапів Д. Д., Сачко Р. Г. Особливості дихальної активності мітохондрій яєчників корів. НТБ Інституту біології тварин та ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок. Львів, 2014. Вип. 15. № 1. С. 175–179. *(Дисертант приготувала*

гомогенати яєчників корів, виділила мітохондрії і дослідила споживання кисню органелами, взяла участь у написанні статті).

9. **Акимишин М. М.** Активність і вміст ізозимів малатдегідрогенази у тканинах яєчників і матки корів впродовж статевого циклу. Біологія тварин. 2017. Т. 19. № 2. С. 9–15.

10. **Акимишин М. М.** Кузьміна Н. В., Остапів Д. Д. Активність та вміст ізозимів аспартатамінотрансферази в репродуктивних органах корів. Науковий вісник ЛНУВМБ ім. С. З. Гжицького. Львів, 2017. Т. 19. № 77. С. 27–31. (Дисертант відбирала репродуктивні органи корів, провела електрофорез і дослідила ізозими аспартатамінотрансферази, взяла участь у написанні статті).

11. **Акимишин М. М.** Кузьміна Н. В., Остапів Д. Д. Активність і вміст ізозимів супероксиддисмутази в тканинах репродуктивних органів корів. НТБ ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок та Інституту біології тварин. Львів, 2017. Вип. 18. № 1. С. 11–19. (Дисертант приготувала гомогенати тканин репродуктивних органів корів, провела електрофорез і дослідила ізозими супероксиддисмутази, взяла участь у написанні статті).

12. Остапів Д., Сачко Р., Мартин Ю., **Акимишин М.**, Грабовська О., Пилипець А. Спосіб отримання естрогенів in vitro: пат. 59121 України на корисну модель UA, МПК (2011/01): А61D7/00.; заявник і патентовласник Інститут біології тварин. № u 2010 10103; заявл. 16.08.2010; опубл. 10.05.2011, Бюл. № 9. 4 с. (Дисертант аспірувала фолікули яєчників корів, відбирала клітини антральної рідини, досліджувала концентрації стероїдних гормонів впродовж культивування та спільно зі співавторами підготувала патент на корисну модель).

13. **Akymyshyn M. M.**, Ostapiv D. D., Simonov R. P., Vlizlo V. V. Concentration of estradiol in reproductive organs of cows depending on ovaries physiological state. Folia Veterinaria. Kosice, 2009. V. 53(№1). P. 115–117. (Дисертант оцінила фізіологічний стан і приготувала гомогенати з тканин статевих залоз, визначила концентрацію естрадіолу, спільно зі співавторами підготувала статтю до друку).

14. Vlizlo V. V., **Akymyshyn M. M.**, Ostapiv D. D., Pylypets A. Z., Grabovs'ka O. S., Martyn Y. V., Sachko R. G. The lipids content in cows ovaries of at different physiological state. XXVI World Buiatrics Congress. Santiago. Chile, 2010. (Дисертант оцінила фізіологічний стан яєчників корів, приготувала гомогенати, спільно зі співавторами проаналізувала отримані дані, підготувала тези до друку).

## АНОТАЦІЯ

**Акимишин М. М. Концентрація статевих гормонів і активність ензимів у тканинах репродуктивних органів за статевого циклу та гіпофункції яєчників корів. — Рукопис.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук за спеціальністю 03.00.04. – біохімія. – Інститут біології тварин НААН, Львів, 2018.

Уперше проведено комплексні дослідження з характеристики енергетичних і окисних процесів в статевій залозі й ендометрії за статевого циклу та гіпофункції яєчника. Доведено, що гонадотропні та стероїдні гормони регулюють активність лактат- і малатдегідрогеназ, аспартатамінотрансферази, ензимів антиоксидантного захисту в тканинах яєчника й ендометрію.

Уперше, на основі кореляції між досліджуваними показниками, виявлено відмінність впливу концентрації гормонів у тканинах репродуктивних органів і антральній рідині на активність ензимів, порівняно з плазмою крові.

Виявлено, що вміст розчинних протеїнів та їх фракцій залежить від досліджуваної тканини, фізіологічного стану чи патології яєчників корів й інтенсивності біохімічних процесів у репродуктивних органах, які характеризуються концентрацією гормонів. Запропоновано спосіб отримання сировини для прототипу препарату зі стимулювання репродуктивної функції самиць. Доведено, що антральну рідину фолікулів яєчників корів доцільно використовувати як джерело природних стероїдних гормонів та біологічно активних речовин для стимулювання відтворної функції самиць. Уведення 0,1 мл середовища культивування самкам лабораторних тварин забезпечило збільшення маси репродуктивних органів, кількості й розміру антральних фолікулів у статевих залозах упродовж 3 діб досліджень на тлі підвищеної концентрації гонадотропних і стероїдних гормонів у плазмі крові. Внутрішньом'язове введення 20,0 мл, дворазово, з інтервалом 11 діб, сировини для виготовлення ветеринарного препарату зі стимулювання відтворної функції коровам з гіпофункцією яєчників відновило стадію збудження статевого циклу у 60,0 % тварин.

**Ключові слова:** корови, репродуктивні органи, гіпофункція яєчника, гонадотропні та стероїдні гормони, лактат- і малатдегідрогенази, аспартатамінотрансфераза, ензими антиоксидантного захисту, протеїни, ізозими.

## АННОТАЦІЯ

**Акимішин М. М. Концентрація половых гормонів и активність ензимів в тканях репродуктивних органів в період полового циклу и гіпофункції яєчників корів. - Рукопись.**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 03.00.04. – биохимия. – Институт биологии животных НААН, Львов, 2018.

Впервые проведены комплексные исследования по характеристике энергетических и окислительных процессов в половой железе и эндометрии при половом цикле и гипofункции яєчників. Установлено, что по сравнению с физиологическим состоянием, при гипofункции яєчника концентрация гормонов в плазме крови коров тестостерона - максимальная, а ЛГ и прогестерона – низкие ( $p < 0,05-0,01$ ), в ткани половой железы: эстрадиола и тестостерона – низкие ( $p < 0,001$ ), в эндометрии: ФСГ – максимальная ( $p < 0,001$ ), а прогестерона – низкие ( $p < 0,001$ ), в антральной жидкости фолликулов концентрация всех исследованных гормонов низкие ( $p < 0,05-0,001$ ). При этом, в ткани яєчника при гипofункции установлена низкая активность энзимов антиоксидантной защиты и аспартатамінотрансферазы ( $p < 0,05-0,001$ ), эндометрии – максимальная лактатдегідрогеназы и низкая малатдегідрогеназы ( $p < 0,01-0,001$ ), в антральной жидкости на 50,0–61,6 % высшая активность каталазы и содержание МСОД и ГПО5 ( $p < 0,05$ ), низкое – ГПО2 ( $p < 0,05$ ).

Доказано, что гонадотропные и стероидные гормоны регулируют активность

лактат- и малатдегидрогеназы, аспаратаминотрансферазы, энзимов антиоксидантной защиты в тканях яичника и эндометрия. При этом, концентрация ФСГ в крови проявляет сильную отрицательную связь с активностью каталазы ( $\eta = 0,794$ ) в ткани яичника, а с другими исследуемыми энзимами в тканях от концентрации ФСГ и ЛГ – корреляция разная по направлению средней силы ( $\eta = 0,307-0,580$ ). Повышение концентрации стероидных гормонов в крови характеризуется разной по направлению средней силы корреляцию с активностью исследуемых энзимов в тканях репродуктивных органов коров ( $\eta = 0,396-0,595$ ).

Впервые, на основе корреляций между исследуемыми показателями, установлено отличие влияния концентраций гормонов в тканях репродуктивных органов и антральной жидкости на величины активности энзимов, по сравнению с плазмой крови.

Выявлено, что содержание растворимых белков и их фракций зависит от исследуемой ткани (половой железы или эндометрия), физиологического состояния или патологии яичников коров и интенсивности биохимических процессов в репродуктивных органах, характеризующихся концентрацией гормонов.

Предложен способ получения сырья для прототипа продукта по стимулированию репродуктивной функции самок. Доказано, что антральную жидкость фолликулов яичников коров целесообразно использовать как источник естественных стероидных гормонов и биологически активных веществ для стимулирования воспроизводительной функции самок. Введение 0,1 мл среды культивирования самкам лабораторных животных обеспечило увеличение массы репродуктивных органов, количества и размера антральных фолликулов в половых железах в течение 3 суток исследований на фоне повышенной концентрации гонадотропных и стероидных гормонов в плазме крови. При внутримышечном введении 20,0 мл, двукратно, с интервалом 11 суток, сырья для изготовления ветеринарного препарата по стимулированию воспроизводительной функции коров с гипофункцией яичников возобновилась половая охота у 60,0 % животных.

**Ключевые слова:** коровы, репродуктивные органы, гипофункция яичника, гонадотропные и стероидные гормоны, лактат- и малатдегидрогеназы, аспаратаминотрансфераза, энзимы антиоксидантной защиты, протеины, изозимы,.

## ANNOTATION

**Akymyshyn M. M. Concentration of sex hormones and activity of enzymes in tissues of reproductive organs at the reproductive cycle and hypofunction of cow ovaries. – Manuscript.**

Thesis for candidate degree of veterinary sciences by speciality 03.00.04 – Biochemistry. – The Institute of Animal Biology NAAN, Lviv, 2018.

The complex investigations of the characteristics of energy and oxidative processes in the sex gland and endometrium at the reproductive cycle and hypofunction of the ovary have been carried out for the first time. It has been proved that gonadotropic and steroid hormones regulate the activity of Lactate and Malate Dehydrogenases, Aspartate

Aminotransferase, antioxidant enzymes in ovarian and endometrial tissues.

The difference between the effects of hormonal concentrations in tissues of reproductive organs and follicular fluid on the magnitude of the activity of enzymes, as compared with the plasma, was established on the basis of correlations between the investigated parameters for the first time.

It was found that the contents of soluble proteins and their fractions depend on the tissue studied, the physiological state or cows ovaries pathology and the intensity of biochemical processes in reproductive organs that are characterized by the concentrations of hormones. The method obtaining raw materials for a prototype of a drugs for stimulation of reproductive function of females is proposed. It was proved that follicular fluid of the follicular antrum has potential as a source of natural steroid hormones and biologically active substances to stimulate reproductive function of females. Treatment with 0.1 ml of culture medium of female laboratory animals provided an increase in the mass of reproductive organs, the number and size of antral follicles in the gonads during 3 days of studies against the background of increased concentrations of gonadotropic and steroid hormones in blood plasma. Twice repeated with 11 days interval, intramuscular injection of 20.0 ml raw materials for the production of a veterinary drug for stimulating the reproductive function of cows with hypofunction of the ovaries has restored a estrous cycle in 60.0 % of animals.

**Key words:** cows, reproductive organs, hypofunction of the ovary, gonadotropic and steroid hormones, lactate and malate dehydrogenase, aspartate aminotransferase, antioxidant enzymes, proteins, isozymes.



