

Установлены изменения содержания протеинов (растворимых и структурных) в культуре клеток и выявлена зависимость от величин их значений способность образовывать стероидные гормоны клетками гранулёзы. Доказано, что интенсивность окислительных процессов и синтез гормонов клетками зависит от продолжительности культивирования, количества пассажей культуры и субстратов в среде. Результаты экспериментальных исследований обеспечили получение сырья для изготовления ветеринарного препарата в 2–5 раз высшей концентрацией половых гормонов, по сравнению с исходной культурой клеток. На основании среды культивирования изготовлен препарат для стимулирования репродуктивной функции коров, содержащий в своём составе среду культивирования клеток гранулёзы фолликулов яичников коров в форме липосомальной эмульсии. После однократного внутримышечного введения 10 мл на животное препарата возобновлялась половая функция у 35,0 %, а после повторного (через 10–12 суток) — ещё у 40,0 % коров.

**Ключевые слова:** окислительно-восстановительные процессы, изозимы, энзимы, лактат- и малатдегидрогеназы, антиоксидантная защита, протеины, клетки гранулёзы, коровы.

#### ANNOTATION

**Bondar Yu. V. Oxidative processes activity and the synthesys of hormones by cow ovarian granulose cells. – Manuscript.**

Thesis for a PhD degree in agricultural sciences, specialty 03.00.04. – biochemistry. – Institute of animal biology NAAS, Lviv, 2016.

The thesis is devoted to the study of respiratory activity and reduction ability, activity and izozyme content of lactate and malate dehydrogenases and antioxidant enzymes, proteins (soluble and structural) in granulose cell layer of cow follicles and their connections with the ability of granulose culture to form steroid hormones. Comprehensive research showed features of redox processes in granulose cell layer of cow follicles, course of which depends on the physiological state of ovarian follicle and size, from which they are derived. It is proved that cells in vitro can form steroid hormones, intensity of steroidogenesis depends on the respiratory activity, reduction ability, lactate and malate dehydrogenase izozymes activity and content in granulose. Features of free radical oxidation, the activity of antioxidant enzymes and izozyme content, formation of sex hormones in granulose were detected. The changes of protein content (soluble and structural) in cell culture and correlation between its indexes and the ability to form sex hormones by granulosa cells were determined. It was been proved that the intensity of oxidative processes and the synthesis of hormones cells depend on the length of cultivation, the number of passages in culture and substrates in medium. The results of experimental studies have provided material for obtaining a veterinary drug that has 2-5 times higher concentrations of sex hormones than in primary cell culture. On the basis of the culture medium a drug was manufactured to stimulate the reproductive function of cows. The drug incorporates the culture medium containing the granulose cells of ovarian follicles cows in the form of liposomal emulsions.

**Keywords:** redox processes, isozymes, enzymes, lactate and malate dehydrogenases, antioxidant defense, proteins, granulose cells, cows.

#### ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Клітини гранульозного шару вистилають внутрішню поверхню фолікула та оточують ооцит, формуючи навколо нього яйценосний горбик (Яблонський В. А. зі співавт., 2006). Їх метаболізм визначається роллю в дозріванні яйцеклітини, а взаємовплив кумульозного оточення й ооцита характеризують високу ймовірність повноцінного дозрівання і запліднення статевої клітини (Pangas S. A., Matzuk M. M., 2005; Guigon C. J., Magre S., 2006; Robert V. et al., 2008; FitzHarris G. et al. 2009). Серед фізіологічних особливостей клітин гранульози є здатність утворювати стероїдні гормони тестостерон, естрадіол і прогестерон (Yang M. Y., Fortune J. E. 2006; Tosca L. et al., 2007). Інтенсивність стероїдогенезу клітин не є сталою величиною й залежить від багатьох чинників: інтенсивності кровообігу, постачання кисню до яєчника і фолікулів, концентрації гонадотропних гормонів, ступеня зрілості цитоплазми і ядра ооцита, наявності субстратів окиснення тощо (Clark R. et al., 2006; Harris S. E. et al., 2007; Zheng X. et al., 2008, Седіло Г. М., Дяченко О. Б., 2013). Функції клітин гранульози забезпечують численні біохімічні процеси, серед яких важливе місце посідають окиснювально-відновні та білоксинтезувальні (Celik E. et al., 2012; Hennet M. L. et al., 2013; Поліщук С. А., Цехмістренко С. І., Коберська В. А., 2014). З'ясовано, що за культивування фолікулів концентрація стероїдних гормонів залежить від вмісту кисню в середовищі (Itoha T. et al., 2002). Ця залежність зумовлена здатністю клітин гранульози використовувати субстрати в процесах окисного метаболізму, нагромаджувати й утилізувати цитотоксичні продукти кисню. При цьому від інтенсивності утворення та перетворення активних форм Оксигену залежать існування гранульози, синтез стероїдних гормонів і біологічно активних речовин як in vivo, так in vitro (Bausenwein J. et al., 2010).

Тому доцільно вивчити особливості окиснювально-відновних процесів у клітинах гранульози in vitro, визначити оптимальні межі їх інтенсивності, за яких забезпечується максимальне утворення стероїдних гормонів, і дослідити можливість використання середовища культивування, як сировини, для виготовлення препарату зі стимулювання відтворювальної функції самок.

**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, 2006–2010 рр.) та «Вивчити біотехнологічні аспекти й механізми синтезу статевих гормонів клітинами гранульози та теоретично обґрунтувати створення нових ветеринарних препаратів» (№ ДР 0111U00615, 2011–2015 рр.). У межах вказаних тем автор досліджувала активність окиснювально-відновних процесів у клітинах гранульози та утворення стероїдних гормонів in vitro і можливість використання середовища культивування, як сировини, для виготовлення препарату зі стимулювання відтворювальної функції самок.

**Мета і завдання дослідження.** Мета роботи полягала у з'ясуванні впливу інтенсивності окиснювально-відновних процесів на здатність утворювати статеві

та концентрацію гормонів у культурі гранульози, статистично опрацювала отримані дані, брала участь у написанні статті).

9. **Боднар Ю. В.** Фізіологічний стан яєчників корів та окисні процеси у клітинах гранульозного шару фолікулів / Ю. В. Боднар, Д. Д. Остапів // XVIII з'їзд Українського фізіологічного товариства (Одеса, 2010). — Фізіологічний журнал. — Т. 56, № 2. — С. 292–293. (Дисертант оцінила фізіологічний стан яєчників, дослідила дихальну активність гранульози, написала тези).

10. Vlizlo V. Oxygen uptake and estrogen production (synthesis) granulosa cells cultivated / V. Vlizlo, Yu. Bodnar, R. Sachko //XXVI World Buiatrics Congress. — Santiago, Chile, 2010. <http://www.kenes.com/buiatrics/cd/pdf/1076.pdf>. (Дисертант дослідила дихальну активність і концентрацію гормонів за культивування гранульози, статистично опрацювала отримані дані).

11. **Боднар Ю.** Активність і вміст ізозимів малатдегідрогенази у культурі клітин гранульози яєчників корів / Ю. Боднар, Н. Кузьміна, Д. Остапів // Молодь і поступ біології. — Львів, 2015. — С. 437–438. (Дисертант визначила активність і вміст ізозимів малатдегідрогенази, опрацювала результати, написала тези).

12. **Боднар Ю. В.** Вміст загального протеїну у культурі клітин гранульози / Ю. В. Боднар // Біологія тварин. — 2015. — Т. 17, № 3. — С. 150.

## АНОТАЦІЯ

**Боднар Ю. В. Активність окисних процесів та утворення гормонів клітинами гранульози яєчників корів. — Рукопис.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата сільськогосподарських наук за спеціальністю 03.00.04. – біохімія. – Інститут біології тварин НААН, Львів, 2016.

Дисертація присвячена вивченню дихальної активності й відновної здатності, активності та вмісту ізозимів лактат- і малатдегідрогеназ й ензимів антиоксидантного захисту, протеїнів (розчинних і структурних) клітин гранульозного шару фолікулів корів та їх зв'язків зі здатністю культури гранульози утворювати стероїдні гормони. Комплексними дослідженнями встановлені особливості окиснювально-відновних процесів у клітинах гранульозного шару фолікулів корів, перебіг яких залежить від фізіологічного стану яєчника і розміру фолікулів, з яких вони отримані. Доведено, що клітини *in vitro* утворюють стероїдні гормони, а інтенсивність стероїдогенезу залежить від дихальної активності, відновної здатності, активності та вмісту ізозимів лактат- і малатдегідрогеназ гранульози.

Проаналізовано особливості перебігу вільнорадикального окиснення за активності і вмістом ізозимів ензимів антиоксидантного захисту та залежність від вказаного процесу утворення гранулозою статевих гормонів. Визначено зміни вмісту протеїнів (розчинних і структурних) у культурі клітин та виявлена залежність від величин їх значень здатність утворювати стероїдні гормони клітинами гранульози. Доведено, що інтенсивність окиснювальних процесів і синтез гормонів клітинами залежать від тривалості культивування, кількості

ветеринарного препарату з вищою в 2–5 разів концентрацією стероїдних гормонів (тестостерону, естрадіолу і прогестерону), ніж у первинній культурі клітин. Розроблено препарат «Фоліген» для стимулювання репродуктивної функції корів: середовище культивування клітин гранульози та ліпосомальна емульсія у співвідношенні 50:50. Запропоновані альтернативні способи оцінювання здатності клітин гранульози синтезувати тестостерон і естрадіол шляхом дослідження активності малатдегідрогенази та вмісту S2-ізозиму супероксиддисмутази.

Основні положення дисертаційної роботи впроваджені у навчальний процес Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького й Одеського державного аграрного університету з дисциплін «Біохімія тварин», «Фізіологія людини і тварин», «Акушерство, гінекологія, біотехнологія».

**Особистий внесок здобувача.** Автор самостійно проведено аналіз літературних даних за темою дисертаційної роботи, експериментальні дослідження та статистичну обробку цифрових даних. Планування експериментальних робіт, інтерпретація результатів досліджень, формулювання висновків здійснено за участі наукового керівника. Оцінювання можливості використання середовища культивування клітин гранульози як компонента ветеринарного засобу зі стимулювання відтворної функції корів проведено за участі співробітників лабораторії молекулярної біології та клінічної біохімії Інституту біології тварин НААН.

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

**Публікації.** Основні результати досліджень за темою дисертації опубліковані в 12 друкованих працях, з них 8 – у наукових фахових виданнях: 2 в науково-теоретичному журналі, 1 – в закордонному журналі, 5 – в науково-технічному бюлетені, 4 тези у збірниках матеріалів науково-практичних конференцій.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів експериментальних досліджень, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, пропозицій виробництву, списку використаних джерел літератури та 3 додатків. Основний зміст роботи викладено на 149 сторінках, ілюстровано 52 таблицями та 9 рисунками. Список використаних джерел налічує 378 найменувань, з яких 347 – латиницею.

«фолікулярного росту», що свідчить про переважання процесів аеробного метаболізму.

4. Культура гранульози з фолікулів яєчників «фолікулярного росту» характеризується підвищеним вмістом ізозимів супероксиддисмутази — СОД1 (18,6 %;  $p < 0,01$ ), СОД2 (19,9 %) і СОД5 (10,5 %;  $p < 0,001$ ), глутатіонпероксидази — ГПО1 (24,2 %;  $p < 0,01$ ) і ГПО2 (25,9 %), каталази — КАТ1 (36,7 %) і, відповідно, високим рівнем антиоксидантного захисту.

5. У культурі клітин з фолікулів яєчників «фолікулярного росту» за  $15,2 \pm 1,04$  мг/мл загального протеїну для його спектра характерний вищий ( $p < 0,01-0,001$ ) вміст  $\gamma 1$ -,  $\beta$ -глобулінів і альбуміну (відповідно  $9,9 \pm 0,85$ ,  $16,8 \pm 1,33$  і  $25,3 \pm 1,50$  %) та найнижчий ( $p < 0,05$ ;  $10,1 \pm 1,30$  %) преальбумінів, порівняно з гранульозою з інших статевих залоз. Аналогічно зі структурних протеїнів найбільше ( $p < 0,05-0,001$ ) з ММ (кДа): більше  $94,6$  ( $8,4 \pm 0,68$  %),  $94,6$  ( $7,8 \pm 0,80$  %),  $66,2-94,6$  ( $9,2 \pm 0,96$  %),  $45,0-66,2$  ( $8,7 \pm 0,66$  %),  $31,0$  ( $7,3 \pm 1,20$  %),  $14,4$  ( $3,7 \pm 0,24$  %) і менше  $14,4$  ( $5,8 \pm 1,02$  %).

6. Активність малатдегідрогенази позитивно корелює з утворенням тестостерону і естрадіолу (відповідно  $\eta = 0,700$  і  $0,802$ ), а вміст S2-ізоциму супероксиддисмутази з концентрацією тестостерону ( $\eta = 0,715$ ).

7. Здатність утворювати стероїдні гормони клітинами гранульози залежить від субстратів у складі середовищ (вищий синтез естрадіолу у RPMI-1640 з  $17$  мг/л пірувату;  $\eta = 0,369$ , а у BME — з  $35$  мг/л;  $\eta = 0,214$ , прогестерону — з  $52$  мг/л;  $\eta = 0,214-0,274$ , а тестостерону — не залежить від доданого субстрату) і тривалості культивування (за більше  $14$  діб знижуються концентрації: на  $79,6-90,6$  % прогестерону, на  $25,0-71,8$  % естрадіолу і на  $40,0-66,7$  % тестостерону;  $p < 0,001$ ) та кількості пасажів культури (за третього — зі статевої залози «фолікулярного росту» знижується синтез естрадіолу;  $p < 0,01$ , а з «пізнього жовтого тіла» — на  $38,6$  % зростає утворення прогестерону).

8. На основі культури клітин гранульози (суміші середовищ культивування 7- і 14-добових культур клітин гранульози) розроблений препарат у формі ліпосомальної емульсії для стимулювання репродуктивної функції корів. Одноразове внутрішньом'язове введення  $10$  мл на тварину препарату відновлювало статево функцію  $35,0$  %, а після повторного (через  $10-12$  діб) — ще  $40,0$  % корів.

## ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

1. З метою відновлення репродуктивної функції корів вводити внутрішньом'язово, дворазово, з інтервалом  $10-12$  діб, по  $10$  мл на тварину препарат «Фоліген».

2. Для оцінювання здатності утворювати тестостерон і естрадіол клітинами гранульози досліджувати активність малатдегідрогенази та вміст S2-ізоциму супероксиддисмутази.

3. Результати досліджень наведені у дисертаційній роботі використовувати в навчальному процесі під час викладання відповідних тем занять на кафедрах біохімії, фізіології та репродуктивної біотехнології.

полярнографічно (нг-атом  $O/xv \times 0,1$  мл суспензії клітин; СК) і відновну здатність — потенціометрично (мВ/  $xv \times 0,1$ мл СК) та з позаклітинним акцептором електронів (калію ферриціаніду;  $K_3[Fe(CN)_6]$ ;  $K_3...$ ;  $10^{-4}M$ ) при  $38,5^\circ C$  у фосфатно-сольовому буфері ( $NaCl - 0,8$  г,  $KCl - 0,02$  г,  $Na_2HPO_4 - 0,11$  г,  $KH_2PO_4 - 0,02$  г,  $MgCl_2 - 0,01$  г,  $H_2O$  до  $100$  мл; pH  $7,4$ ); активність ензимів: лактатдегідрогенази (ЛДГ) і малатдегідрогенази (МДГ) за швидкістю окиснення НАДН (мкмоль (мкМ)/ $xv \times mg$  протеїну; Кочетов Г. А., 1980); супероксиддисмутази (СОД; МО/мг протеїну) — за кількістю утвореного нітроформазану (Чевари С. Н., 1991); глутатіонпероксидази (ГПО; мкМ/ $xv \times mg$  протеїну) — реактивом Елмана (Моин В. М., 1980); каталази (КАТ; мкМ/ $xv \times mg$  протеїну) — з молібдатом амонію (Королук М. А., 1991); вміст ізоцимів ензимів після електрофорезу: СОД — в  $10\%$  поліакриламідному гелі (ПААГ; Beauchamp С., 1971) фарбуванням пластин гелю (Кузьміна Н. В., 2008); КАТ і ГПО — в  $7,5\%$  ПААГ — методами, відповідно, Wodbury W. (1971) та Lin C. L. et al. (2002). Ізоцими ензимів антиоксидантного захисту ідентифікували за Weydert С. J. et al. (2010); ЛДГ і МДГ — в  $7,5\%$  ПААГ — методом Гарбуса (Garbus J., 1971); якісний склад протеїнів культури клітин визначали електрофорезом у ПААГ:  $7,5\%$  — розчинних;  $12,5\%$  — з  $0,1\%$  натрію додецилсульфату (ДСН) та  $2$ -меркаптоетанолу — структурних (Гааль Э. и соавт., 1982) та їх кількісний вміст — програмним забезпеченням TotalLab v2003.02. Ідентифікували окремі протеїни набором білків-маркерів з молекулярними масами (ММ) кДа:  $94,6$  (cellulase),  $66,2$  (BSA),  $45,0$  (Ovalbumin),  $31,0$  (carbonic anhydrase),  $21,5$  (trypsin inhibitor),  $14,4$  (lysozyme); концентрації прогестерону, естрадіолу і тестостерону (нмоль (нМ)/л) упродовж культивування ( $7, 14, 21$  діб і більше) досліджували імуноензимним методом з використанням аналізатора Stat Fax 3000 та наборів реактивів фірми DRG відповідно до інструкції використання тест-систем.

Для вивчення впливу складу середовищ і тривалості культивування на окисні процеси та синтез гормонів культуру клітин досліджували: дихальну активність і відновну здатність без- та з додаванням  $K_3[Fe(CN)_6]$  і концентрації стероїдних гормонів у середовищах DME, BME і RPMI-1640. Для цього отриману суспензію клітин гранульози ділили на три частини, вносили у планшети (діаметр лунок  $3$  см) і культивували у вказаних вище середовищах більше  $21$  доби ( $38-40$  діб).

За дослідження впливу субстратів (натрію пірувату) на інтенсивність окиснювальних процесів і утворення гормонів клітини гранульози культивували в середовищах RPMI-1640 і BME, склад яких балансували: першого — сукцинатом ( $100$  мг/л), а другого — відновленою формою глутатіону ( $1,0$  мг/л). До обох середовищ додавали натрію піруват дозами  $17, 35$  і  $52$  мг/л. Прейнкубовану культуру клітин ( $4-5$  діб у BME) ділили на частини: контрольну — без та дослідні — з додаванням субстрату. Ефективність дії доданого субстрату визначали за кількістю клітин, концентрацією гормонів (естрадіолу, прогестерону та тестостерону) та активністю ензимів (СОД, КАТ, ГПО, МДГ і ЛДГ) упродовж культивування.

З метою з'ясування впливу інтенсивності окиснювальних процесів на здатність гранульози зберігати синтез гормонів провели три пасажі культури гранульози з культивуванням кожного з них упродовж  $14$  діб у RPMI-1640 та дослідженням активності СОД, КАТ, ГПО і концентрації стероїдних гормонів.

оптимум вмісту протеїнів з ММ 21,5 кДа (5–10 %) який забезпечує максимальні величини тестостерону і естрадіолу (відповідно  $5,2 \pm 1,35$  і  $13,0 \pm 1,61$  нмоль/л;  $\eta = 0,391$  і  $0,439$ ), а зі зростанням з ММ 66,2 кДа вони знижуються ( $\eta = 0,378$  і  $0,347$ ). Збільшення вмісту протеїнів з ММ 31,0–45,0 кДа і 14,4 кДа характеризує підвищення концентрації тестостерону ( $\eta = 0,307$  і  $0,372$ ), а за вмісту 2,5–5,0 % з 31,0 кДа виявляється високе його значення ( $5,1 \pm 1,04$  нмоль/л;  $\eta = 0,387$ ). Збільшення вмісту протеїнів з ММ 14,4 кДа характеризує підвищене утворення прогестерону ( $\eta = 0,342$ ), а за менше 14,4 кДа концентрація естрадіолу знижується ( $\eta = 0,302$ ) і за 2,1–3,0 % вказаних протеїнів — виявляється високе значення прогестерону ( $63,2 \pm 8,60$  нмоль/л;  $\eta = 0,390$ ).

**Вплив окремих факторів на інтенсивність окиснювальних процесів і синтез гормонів клітинами гранульози.** Констатовано, що незалежно від складу середовищ, зі збільшенням тривалості культивування до 14 діб дихальна активність і відновна здатність клітин зростають відповідно на 28,0–55,0 % ( $p < 0,001$ ) і 52,1–74,6 % ( $p < 0,01$ ), а за більше 14 діб — знижуються на 32,0–80,0 % ( $p < 0,001$ ) і 17,7–41,7 %. При цьому за 3,3–8,0 нг-атом О/хв $\times$ 0,1 мл СК і 3,4–5,5 мВ/хв $\times$ 0,1 мл СК на 45,9 % ( $p < 0,05$ ) зростає синтез прогестерону і на 61,7 та 50,0 % знижується відповідно естрадіолу і тестостерону. За культивування клітин гранульози понад 21 добу зменшуються споживання кисню і відновна здатність відповідно на 44,2–56,3 % та 36,6 ( $p < 0,05$ ) – 52,0 % ( $p > 0,05$ ) й знижується утворення прогестерону та естрадіолу на 79,6–90,6 % і 25,0–71,8 % ( $p < 0,001$ ). Концентрація тестостерону в ВМЕ і DMEM зменшується відповідно на 66,7 і 40,0 % ( $p < 0,001$ ), а в RPMI-1640 не змінюється ( $0,4 \pm 0,21$  нмоль/л).

Дослідження впливу натрію пірувату на інтенсивність окиснювальних процесів і утворення гормонів клітинами виявило, що впродовж культивування (38–40 діб) синтез естрадіолу високий ( $\eta = 0,369$ ) у середовищі RPMI-1640 з 17 мг/л пірувату, а у ВМЕ — з 35 мг/л. Інтенсивність синтезу прогестерону гранульозою зростає зі збільшенням дози пірувату в обох середовищах і максимальна при 52 мг/л, а тестостерону — не залежить від доданого субстрату. Максимально високий синтез естрадіолу ( $3,1 \pm 1,06$  нмоль/л) клітинами гранульози в RPMI-1640 з 17 мг/л пірувату характеризує високу активність ЛДГ ( $2,4 \pm 0,42$  нмоль/хв $\times$ мг), а прогестерону ( $5,2 \pm 0,62$  нмоль/л) — МДГ ( $1,50 \pm 0,04$  нмоль/хв $\times$ мг;  $\eta = 0,425$ ). У середовищі ВМЕ з піруватом за підвищення активності МДГ виявляється тенденція до зростання концентрації прогестерону. Додавання в середовища культивування в наростаючих дозах пірувату зумовлює в гранульозі з RPMI-1640 підвищення активності СОД (10,2 – 33,4 %) і зниження ГПО (6,7–10,4 %) та КАТ (18,7–21,4 %), а з ВМЕ — зростання активності ГПО (29,7–38,8 %) і КАТ (15,4–30,2 %) та зниження СОД (10,2–33,4 %).

Пасажування клітин впливає на ензиматичну ланку антиоксидантного захисту і стероїдогенезу гранульози: зі збільшенням кількості пасажів знижується активність СОД ( $p < 0,05$  — після другого пасажу з яєчника «ФР»;  $p < 0,01$  — другого і  $p < 0,001$  — третього пасажу яєчника «ПЖТ») та підвищуються КАТ і ГПО. При цьому за першого і другого пасажів клітини з досліджених фізіологічних станів яєчників зберігають здатність утворювати гормони, а за третього — гранульоза з

За культивування у середовищі виникає дефіцит акцептора електронів – Оксигену, оскільки, додавання до культури клітин  $K_3[Fe(CN)_6]$  знижує дихальну активність на 54,3 % і відновну здатність на 14,0 %. Величини досліджуваних показників у гранульозі залежать ще й від розміру фолікулів. Найбільша різниця за дихальною активністю виявлена між клітинами з великого та середнього фолікулів яєчника «ФР» 56,3 % ( $p < 0,001$ ), а за відновною здатністю – зі «СО», у яких  $3,3 \pm 0,84$  К<sub>3</sub>.../хв $\times$ 0,1мл СК з 4–7 мм, і вища на 30,3–33,3 % – з малого і великого. Таким чином, найвищою дихальною активністю характеризується культура клітин з фолікулів яєчників «фолікулярного росту».

**Активність і вміст ізозимів лактатдегідрогенази та малатдегідрогенази клітин гранульозного шару фолікулів корів.** Активність ЛДГ у культурі гранульози висока ( $2,1 \pm 0,19$  мкМ/хв $\times$ мг протеїну) з фолікулів яєчників «РЖТ», менша на 4,8 % з «ФР» і «СО» і ще нижча (на 9,4 %) з «ПЖТ» (табл. 2).

Таблиця 2

**Активність лактатдегідрогенази та малатдегідрогенази клітин гранульозного шару фолікулів корів**

Активність ензимів, мкмоль/хв $\times$ мг протеїну	Фізіологічний стан яєчника							
	«свіжа овуляція»		«раннє жовте тіло»		«пізнє жовте тіло»		«фолікулярний ріст»	
	n	M $\pm$ m	n	M $\pm$ m	n	M $\pm$ m	n	M $\pm$ m
ЛДГ	9	2,0 $\pm$ 0,31	9	2,1 $\pm$ 0,19	9	1,9 $\pm$ 0,18	51	2,0 $\pm$ 0,35
МДГ	9	1,9 $\pm$ 0,20	9	1,4 $\pm$ 0,12	15	1,1 $\pm$ 0,09**	128	1,0 $\pm$ 0,14****

За активності 1,0–1,1 мкМ/хв $\times$ мг протеїну МДГ у клітин з яєчників фізіологічних станів «ФР» та «ПЖТ» вона на 21,4 % ( $p < 0,01$ ) вища з «РЖТ» і найвища ( $1,9 \pm 0,20$  мкМ/хв $\times$ мг протеїну;  $p < 0,001$ ) зі «СО». Залежно від розміру фолікула активність ЛДГ низька ( $1,4$  мкМ/хв $\times$ мг протеїну) в культурі клітин з малих фолікулів «РЖТ» і «ПЖТ», а найвища ( $2,7 \pm 0,10$  мкМ/хв $\times$ мг протеїну;  $p < 0,001$ ) з 4–7 мм «РЖТ». Активність МДГ максимальна ( $2,5 \pm 0,24$  мкМ/хв $\times$ мг протеїну) з малого фолікула яєчника «СО», нижча на 24,0–36,0 % ( $p < 0,05$ ) з середніх — «СО» і «РЖТ», а з інших за розміром фолікулів і фізіологічних станів яєчників ще на 48,0–60,0 % менша ( $p < 0,01$ – $0,001$ ).

Активність ЛДГ і МДГ забезпечують по 5 ізозимів, які відрізняються рухливістю в електричному полі, а смуги протеїнів на фореграмах виявляються неоднаковою площею та інтенсивністю зафарбування (рис. 2, 3). Виявлені різниці

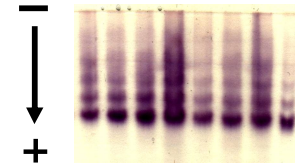


Рис. 2. Ізозими лактатдегідрогенази культури клітин гранульози

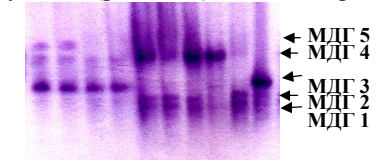


Рис. 3. Ізозими малатдегідрогенази культури клітин гранульози

Вміст фракцій розчинних протеїнів за культивування клітин, більшою мірою визначається розміром фолікулів, з яких отримана гранульоза. Зокрема, більші ( $p < 0,05-0,01$ ) значення виявлені в культурі з фолікулів — глобулінів:  $\gamma 3$ – з більше 7 мм яєчника «ПЖТ» (17,0 $\pm$ 3,47 %),  $\gamma 1$ – з менше 7 мм «ФР» (10,6–10,8 %),  $\beta$ – і альбуміну з 4–7 мм «ФР» (16,1 $\pm$ 2,62 % і 27,0 $\pm$ 2,50 %),  $\alpha 2$ – і  $\alpha 1$ – відповідно з менше 4 і менше 7 мм яєчника «СО» (9,0 $\pm$ 1,35 і 13,6–13,9 %). Вміст преальбумінів високий (20,3 %) у гранульозі з малих і середніх фолікулів відповідно яєчників «ПЖТ» і «РЖТ». Не виявлено відмінностей між вмістом  $\gamma 2$ - і  $\alpha 3$ -глобулінів у клітин залежно від розміру фолікулів: значення в межах відповідно 10,2–14,9 і 5,9–9,5 %, різниця 4,6–4,7 % ( $p > 0,05$ ).

Залежно від розміру фолікулів та фізіологічного стану яєчників з яких вилучена гранульоза, існують особливості вмісту структурних протеїнів. Зокрема, в культурі клітин з яєчника «ФР» вищий вміст протеїнів з ММ (кДа): більше 94,6 (8,4 $\pm$ 0,68 %), 94,6 (7,8 $\pm$ 0,80 %), 66,2–94,6 (9,2 $\pm$ 0,96 %), 45,0–66,2 (8,7 $\pm$ 0,66 %), 31,0 (7,3 $\pm$ 1,20 %), 14,4 (3,7 $\pm$ 0,24 %) і менше 14,4 (5,8 $\pm$ 1,02 %). При цьому високий вміст протеїну з ММ 66,2 кДа (альбуміну; 12,8 $\pm$ 2,79 %) у гранульозі з яєчника «РЖТ», з ММ 21,5–31,0 кДа (8,0 $\pm$ 1,30 %) і 14,4–21,5 кДа (23,6 $\pm$ 1,80 %) — зі «СО», а з ММ 21,5 кДа (10,6–12,7 %) — зі «СО» і «ПЖТ». Не виявлено залежності протеїнів зон ММ 45,0 і 31,0–45,0 кДа від фізіологічного стану яєчника з якого вилучена гранульоза – вміст у межах відповідно 9,7–11,6 і 6,1–7,5 % ( $p > 0,05$ ). Крім залежності вмісту окремих структурних протеїнів у культурі клітин від фізіологічного стану яєчника, встановлено відмінності їх значень у зв'язку з розміром фолікула, з яких вилучена гранульоза, що свідчить про індивідуальний рівень метаболізму, здатність клітин використовувати й утворювати протеїни.

**Концентрація гормонів у культурі клітин гранульози.** За культивування клітини утворюють найбільше: тестостерону (3,7 $\pm$ 0,37 нМ/л) — з фолікулів яєчника «ФР» і менше (1,2–1,5 нМ/л;  $p < 0,01-0,001$ ) з інших фізіологічних станів статевих залоз; естрадіолу (9,6–10,3 нМ/л) — з «ФР» і «СО», а найменше (5,8 $\pm$ 0,90 нМ/л) з «ПЖТ»; прогестерону (53,2 $\pm$ 8,85 нМ/л) — з «ПЖТ», нижче на 39,3–41,4 % ( $p < 0,05$ ) з «РЖТ» і «СО» і на 30,6 % з «ФР» (табл. 3). Інтенсивність синтезу

Таблиця 3

**Концентрація гормонів у культурі клітин гранульози залежно від фізіологічного стану яєчника, нмоль/л; М $\pm$ m**

Фізіологічний стан яєчника	Концентрація гормонів:					
	n	тестостерон	n	естрадіол	n	прогестерон
«свіжа овуляція»	9	1,2 $\pm$ 0,37***	13	10,3 $\pm$ 2,90	13	31,2 $\pm$ 9,86
«раннє жовте тіло»	15	1,5 $\pm$ 0,66**	41	8,3 $\pm$ 1,50	41	32,3 $\pm$ 5,17*
«пізнє жовте тіло»	16	1,3 $\pm$ 0,56***	32	5,8 $\pm$ 0,90**	27	53,2 $\pm$ 8,85
«фолікулярний ріст»	51	3,7 $\pm$ 0,37	84	9,6 $\pm$ 0,90	81	36,9 $\pm$ 3,86

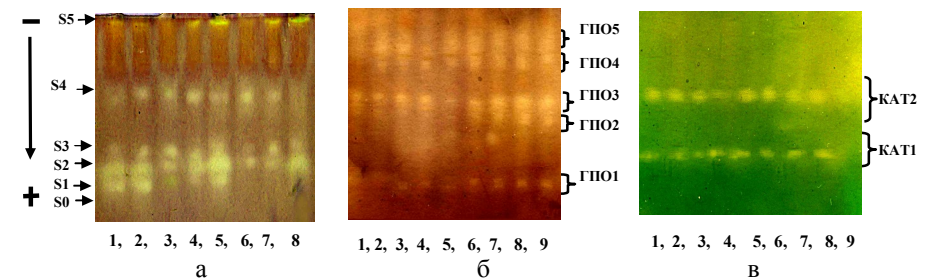
стероїдних гормонів залежить від розміру фолікулів, з яких аспірована гранульоза: найбільше утворюють тестостерону клітини з фолікулів більше 7 мм яєчника «ФР» (4,6 $\pm$ 0,63 нМ/л), естрадіолу — з великих та малих — «СО» і великого — «ФР» (11,9–14,7 нМ/л), прогестерону — з більше 7 мм «ПЖТ» (71,7 $\pm$ 13,09 нМ/л).

малат та постачання субстратів у цикл трикарбонових кислот з ресинтезом АТФ у дихальному ланцюзі мітохондрій.

**Активність і вміст ізозимів ензимів антиоксидантного захисту за культивування клітин гранульози.** Клітини за культивування виявляють активність СОД — 12,4 $\pm$ 0,74 МО/мг протеїну, ГПО і КАТ — відповідно 0,61 $\pm$ 0,06 і 0,39 $\pm$ 0,02 мкМ/хв $\times$ мг протеїну. При цьому, величини їх значень залежать як від фізіологічного стану яєчника, так і від розміру фолікулів, з яких отримані клітини. Так, активність 17,0–18,2 МО/мг протеїну СОД характерна для культури зі статевих залоз «СО» та «ПЖТ», на 31,8–36,3 % нижча з «ФР» і ще менша на 55,5 % ( $p < 0,01$ ; 8,1 $\pm$ 1,41 МО/мг протеїну) з «РЖТ». ГПО клітин з «РЖТ» — 0,09 $\pm$ 0,01 мкМ/хв $\times$ мг протеїну, на 64,0 % вища зі «СО» і на 86,0–89,7 % ( $p < 0,001$ ) більша з «ФР» та «ПЖТ». Активність КАТ 0,34–0,36 мкМ/хв $\times$ мг протеїну виявляється у клітин з «РЖТ» і «ФР» та 0,53–0,56 мкМ/хв $\times$ мг протеїну зі «СО» і «ПЖТ». Отже, неоднозначна інтенсивність нагромадження активних форм Оксигену в культурі гранульози зумовлена фізіологічним станом яєчника, з якого вилучені клітини: високе утворення  $O_2^{\cdot -}$  і  $H_2O_2$  — зі «свіжої овуляції» і «пізнього жовтого тіла» та нагромадження фізіологічних рівнів  $H_2O_2$  і  $OH^{\cdot -}$  — з «фолікулярного росту».

Залежно від розміру фолікула, активність СОД в культурі клітин з діаметра 4–7 мм яєчника «РЖТ» низька (6,8 $\pm$ 1,72 МО/мг протеїну), а з фолікулів менше 4 мм статевої залози «СО» вища на 65,7 % ( $p < 0,01$ ; 19,8 $\pm$ 3,75 МО/мг протеїну). Активність ГПО з фолікулів менше 7 мм яєчника «РЖТ» мінімальна (0,08–0,09 мкМ/хв $\times$ мг протеїну) і більш ніж в 11 разів вища з малого «ПЖТ» ( $p < 0,001$ ; 1,01 $\pm$ 0,37 мкМ/хв $\times$ мг протеїну). КАТ гранульози з фолікулів менше 7 мм яєчника «ФР» однакова (0,30 мкМ/хв $\times$ мг протеїну) і на 40,0 % ( $p < 0,01$ ) вища з великого, а у клітин з інших діаметрів фолікулів та фізіологічних станів яєчників, активність ензиму становить 0,51–0,57 мкМ/хв $\times$ мг протеїну і не відрізняється ( $p > 0,05$ ).

Активність ензимів антиоксидантного захисту забезпечують окремі ізономи, які після електрофорезу і фарбування на фореграмах виявляються різним числом активних протеїнів та неоднаковою інтенсивністю і відповідно вмістом (рис. 6).



**Рис. 6. Ізономи ензимів антиоксидантного захисту культури клітин гранульози: а — СОД; б — ГПО; в — КАТ; 1–9 — треки протеїнів**

При цьому вміст ізозимів культури клітин, як і активність ензимів, залежить від фізіологічного стану яєчника та розміру фолікулів з яких вилучена гранульоза. У процесі електрофорезу в 10,0% ПААГ СОД виявляється 5–6 смугами протеїнів з активністю ензиму, які за електрофоретичною рухливістю відповідають

позаклітинному (S5; ES-COD), мітохондріальному (S4; Mn-COD) та цитозольним (S0, S1, S2 і S3; Cu,Zn-COD) ізоцимам (рис. 6, а). Для гранульози з яєчника «ФР» за культивування характерний високий вміст Cu,Zn- та ES-COD (відповідно, 18,6–19,9 та 10,5±0,69 %) і понижений Mn-COD (31,3±1,59 %); «ПЖТ» – підвищений вміст S2 Cu,Zn- (22,6±2,75 %) і ES-COD (13,6±1,74 %); «РЖТ» – високий вміст Mn- і ES-COD (відповідно 44,7±5,36 та 12,7±1,19 %) та знижений Cu,Zn-COD (13,3–15,7 %); «СО» — високий вміст S3 (29,3±7,06 %) та низький Mn- (29,7±7,09 %) і ES-COD (6,7±0,72 %). Отже, для культури клітин гранульози з яєчника «фолікулярного росту» нагромадження  $O_2^-$  в мітохондріях низьке, а з інших фізіологічних станів статевих залоз за культивування активуються процеси утворення  $O_2^{\cdot-}$  в цитозолі – з «пізнього жовтого тіла» та «свіжої овуляції» і в мітохондріях – з «раннього жовтого тіла». Крім цього, для гранульози з яєчника «свіжої овуляції» характерний низький захист зовнішньої поверхні мембрани клітин від  $O_2^{\cdot-}$ .

Дослідженням ізоцимів ГПО виявлено на фореграмах 5–6 безбарвних смуг протеїнів ензиму, різної площі та інтенсивності (рис. 6, б). При цьому вміст ГПО1 в культурі клітин високий (24,2±2,13 %) з яєчників «ФР» і найнижчий (14,7±2,93 %; 9,5 %,  $p < 0,01$ ) зі «СО». Вміст інших ізоцимів ГПО у гранульозі, залежно від фізіологічного стану статевої залози, виявляв невірогідні, але тенденційно вищі значення: ГПО2 — з «РЖТ» (31,3±5,88 %), ГПО3 — зі «СО» (29,8±5,20 %), ГПО4 — з «ПЖТ» (20,9±5,50 %), ГПО5 — з яєчників «ПЖТ» і «СО» (19,9–22,7 %). Таким чином, вміст ізоцимів ГПО, залежно від фізіологічного стану яєчника, свідчить про здатність гранульози підтримувати оптимальний рівень утворення і знищення  $H_2O_2$  та  $OH^{\cdot-}$  і забезпечувати виживання клітин. Оскільки ГПО1 знищує пероксили ліпідів і захищає протеїни від окиснення (Arthur J. R., 2000), високий вміст вказаного ізоциму в культурі клітин з яєчників «фолікулярного росту» свідчить як про ймовірне підвищене утворення  $H_2O_2$ , так і про здатність захищати структурні компоненти клітин.

Активність КАТ виявляється на фореграмах двома світлими не зафарбованими смугами протеїнів (рис. 6, в). При цьому вміст ізоцимів у культурі клітини гранульози слабо залежить від фізіологічного стану яєчників — значення у межах: КАТ1 — 30,2–36,7 % та КАТ2 — 63,3–69,8 %.

З урахуванням розміру фолікулів та фізіологічних станів яєчників, з яких отримана культура клітин, з'ясовано, що вміст S1- і S3-ізоцимів СОД високий, відповідно 21,0±5,17 і 46,0±0,94 % з діаметра більше 7 мм яєчника «СО», а нижчий на 12,0 % ( $p < 0,05$ ) з малого і на 33,0 % ( $p < 0,001$ ) зі середнього «РЖТ». Високий вміст S2 характерний для гранульози з фолікулів 4–7 мм яєчника «СО» (37,0±1,41 %), а низький (5,0–6,0 %;  $p < 0,001$ ) з середнього і великого відповідно «РЖТ» і «СО». У клітинах з фолікулів 4–7 мм яєчника «РЖТ» вміст S4 високий (54,0±2,36 %) і нижчий на 34,0 % ( $p < 0,001$ ; 20,0±0,94 %) з великого «СО». Найвищий вміст (16,8±3,03 %) S5-ізоциму виявляється в культурі з фолікула менше 4 мм яєчника «ПЖТ», а низький (5,0±0,24 %;  $p < 0,01$ ) з 4–7 мм «СО».

Подібні відмінності виявлені при дослідженні вмісту ізоцимів ГПО. Так, найвищий вміст ГПО1 (24,9–26,4 %) характерний для клітин з фолікулів яєчників фізіологічних станів: малого й великого — «ФР» та середніх — «РЖТ» і «ПЖТ»,

ГПО2 — з малого «РЖТ» (42,6±11,31%), ГПО3 — зі середнього «СО» (42,5±24,40 %), ГПО4 (28,8±13,40 %) і ГПО5 (38,0±11,90 %) з фолікулів відповідно менше 4 мм і 4–7 мм «ПЖТ».

Вміст ізоцимів КАТ у культурі також залежить від розміру фолікулів, з яких аспірована гранульоза: вміст КАТ1 знижений (11,3–13,4 %) у клітин з 4–7 мм яєчника «СО» та менше 4 мм «РЖТ», а вміст КАТ2, навпаки, максимально високий (86,6–88,7 %). Отже, найнижчим вмістом КАТ1, як і відповідно найвищим КАТ2 характеризуються клітини з середнього фолікула яєчника «СО» та малого — «РЖТ».

Таким чином, культура клітин отримана з великого фолікула яєчників «фолікулярного росту» та «пізнього жовтого тіла» характеризуються стабільно високою активністю ензимів антиоксидантного захисту. Підвищена активність СОД та КАТ і знижена ГПО в культурі гранульози з фолікулів яєчника «свіжої овуляції», низька активність СОД та ГПО з великого і середнього — «раннього жовтого тіла» вказують на дисбаланс окиснювальних процесів та нагромадження вільних радикалів Оксигену й знижену здатність до виживання клітин.

**Спектр протеїнів культури клітин гранульози з фолікулів яєчників корів.** У культурі гранульози з яєчників «ФР» 15,2±1,04 мг/мл загального протеїну, на 15,8 % більше — з «РЖТ» й на 22,2 та 34,2 % менше відповідно з «ПЖТ» і «СО». Поряд з відмінністю вмісту загального протеїну в культурі клітин відрізняється якісно й кількісно спектр розчинних і структурних протеїнів (рис. 7, 8). Зокрема, в

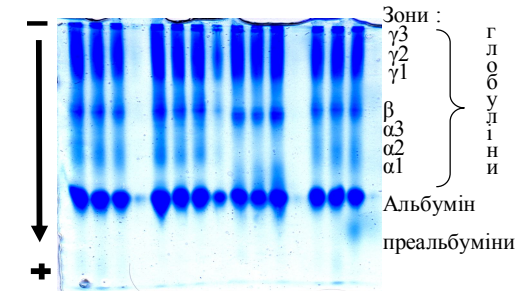


Рис. 7. Розчинні протеїни культури клітин гранульози: 7,5% ПААГ

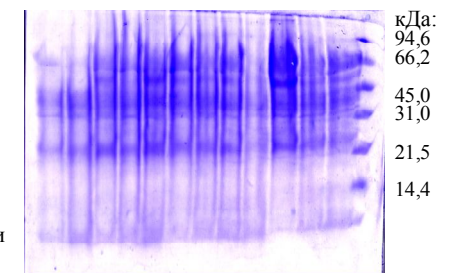
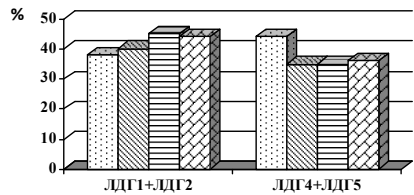


Рис. 8. Спектр протеїнів культури клітин гранульози: 12,5% ДСН ПААГ

зоні рухливості  $\gamma_2$ - і  $\gamma_3$ -глобулінів, незалежно від фізіологічного стану яєчників, вміст однаковий відповідно 10,8–12,6 і 10,8–12,9 %,  $\gamma_1$ - ,  $\beta$ -глобулінів і альбуміну максимальний (9,9±0,85, 16,8±1,33 і 25,3±1,50 %) з «ФР». Проте вміст  $\alpha_1$ - ,  $\alpha_2$ - і  $\alpha_3$ -глобулінів вищий на 0,6–4,3 % ( $p < 0,05$ ) у культурі клітин з яєчників «СО» (7,0–11,6 %) порівняно з іншими фізіологічними станами. Вміст преальбумінів у гранульозі зі статевої залози «ФР» найнижчий (10,1±1,30 %), вищий на 4,0–6,1 % ( $p < 0,05$ ) зі «СО» і «ПЖТ», а найвищий (17,9±3,30 %) з «РЖТ»,  $\alpha_2$ - і  $\alpha_3$ -глобулінів вищий на 0,6–4,3 % ( $p < 0,05$ ) у культурі клітин з яєчників «СО» (7,0–11,6 %) порівняно з іншими фізіологічними станами. Вміст преальбумінів у гранульозі зі статевої залози «ФР» найнижчий (10,1±1,30 %), вищий на 4,0–6,1 % ( $p < 0,05$ ) зі «СО» і «ПЖТ», а найвищий (17,9±3,30 %) з «РЖТ».

зумовлені як фізіологічним станом яєчників, так і розміром фолікулів, з яких отримані клітини. Зокрема, високий вміст ЛДГ5 (21,1±1,83 %) і ЛДГ4 (22,9±2,45 %) характерний для культури гранульози зі статевої залози «СО», ЛДГ3 (25,4±3,32 %) з «РЖТ», вміст ЛДГ2, незалежно від фізіологічного стану яєчника, в межах 16,5–19,0 %, а вміст ЛДГ1 найвищий (26,9±3,59 %) у клітин з фолікулів яєчника «ПЖТ». Із аналізу вмісту ізозимів ЛДГ випливає, що клітини з фолікулів яєчників «ПЖТ» і «ФР» перетворюють лактат на піруват зі стимулюванням активності циклу трикарбонових кислот і мітохондріального дихання (ЛДГ1+ЛДГ2 — 44,1–45,1 %, проти ЛДГ4+ЛДГ5 — 35,2–36,0 %), а у гранульозі з яєчника «СО» переважає нагромадження лактату (ЛДГ4+ЛДГ5 — 44,0 % проти ЛДГ1+ЛДГ2 — 38,0 %; рис. 4). Залежно від розміру фолікулів виявлено, що 36,3±6,68 % ЛДГ1 в гранульозі,

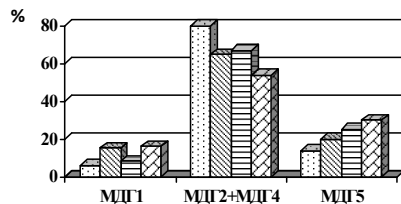


□ свіжа овуляція ▨ раннє ▨ пізнє жовте тіло ▨ фолікулярний ріст

**Рис. 4. Вміст ізозимів лактатдегідрогенази клітин гранульози**

великого «СО». У гранульозі з фолікула більше 7 мм яєчника «СО» вміст ЛДГ4 і ЛДГ5 високий (відповідно 29,7±2,13 і 26,3±1,52 %), а найнижчий (10,7–13,4 %;  $p < 0,05-0,01$ ) з малих і великих «ПЖТ» та малих «РЖТ».

Залежно від фізіологічного стану яєчників корів високий вміст МДГ1 та МДГ5 (відповідно 16,3±1,44 і 30,2±2,37 %;  $p < 0,001$ ) у клітин з фолікулів статевих залоз «ФР», МДГ2 (20,2±6,39 %) з «РЖТ», МДГ3 (41,2±5,88 %) з «ПЖТ», МДГ4 (28,9±3,60 %) зі «СО». Крім цього, залежно від розміру фолікулів з яких отримані клітини, у культурі гранульози високий вміст: МДГ1 (18,5–19,4 %) з діаметру



□ свіжа овуляція ▨ раннє ▨ пізнє жовте тіло ▨ фолікулярний ріст

**Рис. 5. Вміст ізозимів малатдегідрогенази клітин гранульози**

яка культивована з діаметра менше 4 мм яєчника «ПЖТ», а 15,0–17,0 % ( $p < 0,05$ ) з великих — «РЖТ» і «СО». Вміст ЛДГ2 у клітин з малих фолікулів статевої залози «ПЖТ» і «РЖТ» й великих «СО» становить 13,0–13,7 % і вищий на 4,3–7,5 % з іншого діаметра ( $p > 0,05$ ). У клітин з великого фолікула яєчника «РЖТ» вміст ЛДГ3 високий (31,0±5,06 %) і менший на 17,7 % ( $p < 0,05$ ) з великого «СО». У гранульозі з фолікула більше 7 мм яєчника «СО» вміст ЛДГ4 і ЛДГ5 високий (відповідно 29,7±2,13 і 26,3±1,52 %), а найнижчий (10,7–13,4 %;  $p < 0,05-0,01$ ) з малих і великих «ПЖТ» та малих «РЖТ».

Залежно від фізіологічного стану яєчників корів високий вміст МДГ1 та МДГ5 (відповідно 16,3±1,44 і 30,2±2,37 %;  $p < 0,001$ ) у клітин з фолікулів статевих залоз «ФР», МДГ2 (20,2±6,39 %) з «РЖТ», МДГ3 (41,2±5,88 %) з «ПЖТ», МДГ4 (28,9±3,60 %) зі «СО». Крім цього, залежно від розміру фолікулів з яких отримані клітини, у культурі гранульози високий вміст: МДГ1 (18,5–19,4 %) з діаметру більше 7 мм яєчників «СО» та «ФР» і 4–7 мм — «РЖТ», МДГ2 (26,0±5,12 %) з менше 4 мм «РЖТ», МДГ3 (45,1±8,79 %), МДГ4 (26,3±4,20 %) і МДГ5 (28,1–28,5 %) з великих фолікулів «ПЖТ» і «ФР» (рис. 5).

Таким чином, у культурі клітин з фолікулів яєчників «ПЖТ» і «ФР» переважають процеси аеробного метаболізму з перетворенням в цитозолі лактату на піруват і оксалоацетату на

### **Кореляції між інтенсивністю окиснювальних процесів, вмістом протейнів та утворенням гормонів клітинами гранульози фолікулів яєчників корів.**

Культура клітин за дихальної активності 3–4 нг-атом O / хв×0,1 мл СК синтезує високу концентрацію тестостерону ( $\eta = 0,472$ ) і прогестерону ( $\eta = 0,368$ ). При цьому утворення естрадіолу залежить ( $\eta = 0,466$ ) від інтенсивності позаклітинного транспорту електронів. Але, відтік електронів з мітохондрій і цитозолу клітин (присутність акцептора електронів) у позаклітинний простір знижує синтез тестостерону та естрадіолу (відповідно  $\eta = 0,394$  і 0,348) та підвищує — прогестерону ( $\eta = 0,385$ ). Залежність утворення стероїдних гормонів від окисного метаболізму культури клітин підтверджує активність ЛДГ, величина якої корелює з середньою силою ( $\eta = 0,331-0,378$ ) з концентраціями тестостерону, естрадіолу і прогестерону. Подібну силу кореляцій ( $\eta = 0,319-0,335$ ) виявлено між вмістом ізозимів ЛДГ і концентрацією стероїдних гормонів. Однак між вмістом ЛДГ1 і ЛДГ3 та концентрацією тестостерону існує вища за силою негативна кореляція ( $\eta = 0,600-0,635$ ). Ще вища за силою позитивна залежність концентрацій тестостерону і естрадіолу (відповідно  $\eta = 0,700$  і 0,802) виявляється з активністю МДГ. Однак аналіз кореляцій вмісту окремих ізозимів МДГ з концентрацією стероїдних гормонів свідчить про залежність середньої сили ( $\eta$  не перевищує 0,529), що характеризує взаємодію ізозимів у забезпеченні як активності ензиму (в цитозолі і мітохондріях), так і утворення клітинами гормонів. Від активності СОД залежить концентрація тестостерону ( $\eta = 0,306$ ). При цьому на утворення клітинами тестостерону чинить сильний позитивний вплив вміст S2 ( $\eta = 0,715$ ), і навпаки, вміст 15,0–20,0 % S3 характеризує його низькі концентрації ( $\eta = 0,629$ ), як і підвищення вмісту Mn-СОД (S4;  $\eta = 0,536$ ) і Cu,Zn - ESCOD (S5;  $\eta = 0,593$ ). Вплив інших ізозимів СОД на стероїдогенез культури різний за напрямом і середній за силою ( $\eta = 0,343-0,460$ ). У гранульозі за підвищення активності ГПО зростає утворення прогестерону ( $\eta = 0,554$ ). Водночас, за середнього вмісту ГПО1 і ГПО2 (15–30 %), ГПО4 (5 – 15 %) і ГПО5 (15–20 %) концентрація тестостерону низька (2,7–2,9 нмоль/л;  $\eta = 0,388-0,513$ ), а за підвищення ГПО3 синтез гормону знижується ( $\eta = 0,393$ ). Однак за збільшення вмісту ГПО3 зростає утворення естрадіолу ( $\eta = 0,418$ ), а за ГПО4 — знижується ( $\eta = 0,388$ ). Підвищення активності КАТ призводить до зниження утворення прогестерону ( $\eta = 0,404$ ). При цьому за підвищення КАТ1 зменшується синтез тестостерону ( $\eta = 0,446$ ), а за КАТ2, навпаки, зростає ( $\eta = 0,545$ ).

Зі збільшенням вмісту загального протеїну в культурі клітин концентрація тестостерону знижується ( $\eta = 0,500$ ), а прогестерону — зростає ( $\eta = 0,524$ ). При цьому за підвищення вмісту глобулінів:  $\gamma_3$  — зростає синтез тестостерону і прогестерону ( $\eta = 0,438$  і 0,373), а  $\beta$  — знижується концентрація естрадіолу ( $\eta = 0,338$ ). Збільшення в культурі вмісту альбуміну характеризує зростання концентрації тестостерону ( $\eta = 0,505$ ), а преальбумінів — естрадіолу ( $\eta = 0,325$ ).

Поряд зі встановленою залежністю інтенсивності стероїдогенезу від розчинних, зі збільшенням структурних протеїнів з ММ більше 94,6 і 45,0 кДа зростає концентрація естрадіолу ( $\eta = 0,327$  і 0,413), а з ММ 45,0–66,2, 21,5–31,0 і 14,4–21,5 кДа — тестостерону і естрадіолу ( $\eta = 0,335-0,480$ ). Крім цього, існує

Для вивчення можливості використання середовища культивування клітин гранульозного шару фолікулів яєчників корів як компонента ветеринарного засобу зі стимулювання відтворювальної функції самок на основі суміші середовищ культивування 7- і 14-добових культур клітин виготовили препарат з умовною назвою «Фоліген» у формі ліпосомальної емульсії (50:50). Для апробування ефективності препарату спільно з лікарями ветеринарної медицини було відібрано 50 корів чорно-рябої молочної породи, аналогів за віком і продуктивністю, які не приходили в охоту два місяці і більше після отелення з діагнозом, після ректального дослідження і оцінювання фізіологічного стану статевих залоз — гіпофункція яєчників. Тваринам дослідної групи (40 корів) внутрішньом'язово вводили препарат «Фоліген» у формі ліпосомальної емульсії дозою 10 мл на тварину. Повторно препарат вводили через 10-12 діб дозою 10 мл коровам, які не прийшли в охоту. Тваринам контрольної групи (10 корів) вводили препарат «Естрофан» згідно з настановою для застосування. Ефективність дії препаратів оцінювали за відсутністю статевих циклів у корів через 2-3 місяці після штучного осіменіння, у сумнівних випадках – ректальним дослідженням.

Статистичний аналіз отриманих результатів проведено методами варіаційної статистики з використанням t-критерію Стьюдента і кореляційного відношення ( $\eta^2$ ; Плохинский Н. А., 1970). Різницю між середніми арифметичними значеннями вважали статистично вірогідною: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

**Дихальна активність і відновна здатність клітин гранульози.** Дихальна активність клітин гранульози –  $5,9 \pm 0,28$  нг-атом  $O_2$ /хв  $\times 0,1$  мл СК, а відновна здатність –  $4,3 \pm 0,19 K_3 \dots$ /хв  $\times 0,1$  мл СК. При цьому, величини показників у культурі клітин залежать від фізіологічного стану статевих залоз з яких вони вилучені, – за дихальною активністю різниця між мінімальним і максимальним значенням становить 55,8 % ( $p < 0,001$ ) і менша відмінність виявлена за відновною здатністю –  $4,1-4,8 K_3 \dots$ /хв  $\times 0,1$  мл СК ( $p > 0,05$ ; табл. 1).

Таблиця 1

### Дихальна активність і відновна здатність клітин гранульози

Дихальна активність і відновна здатність	Фізіологічний стан яєчника								
	«свіжа овуляція»		«раннє жовте тіло»		«пізнє жовте тіло»		«фолікулярний ріст»		
	n	M $\pm$ m	n	M $\pm$ m	n	M $\pm$ m	n	M $\pm$ m	
нг-атом $O_2$ / хв $\times 0,1$ мл СК	$O_2$	41	$3,1 \pm 0,42$ ***	63	$3,9 \pm 0,58$ ***	70	$4,8 \pm 0,78$ *	157	$7,0 \pm 0,47$
	$K_3 \dots$	41	$2,5 \pm 0,42$	63	$2,9 \pm 0,39$	70	$3,0 \pm 0,44$	157	$2,6 \pm 0,30$
$K_3 \dots$ / хв $\times 0,1$ мл СК	$O_2$	41	$4,1 \pm 0,48$	63	$4,8 \pm 0,51$	70	$4,6 \pm 0,43$	157	$4,1 \pm 0,31$
	$K_3 \dots$	41	$2,8 \pm 0,51$	63	$4,1 \pm 0,44$	70	$4,0 \pm 0,47$	157	$3,7 \pm 0,35$

**Примітка.** У цій і наступних таблицях різниця статистично вірогідна порівняно з максимальною величиною значення показника: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

фолікулів статевої залози «ФР» знижує синтез естрадіолу ( $p < 0,01$ ), а з «ПЖТ» — зростає інтенсивність утворення прогестерону.

**Апробування ефективності препарату «Фоліген» на основі середовища культивування клітин гранульози.** У результаті використання препарату «Фоліген», після першого введення, в охоту прийшло 14 корів (35,0 %), а після повторного — ще 16 голів (40,0 %). Після дворазового введення препарату «Фоліген» 30 корів із 40 дослідних (75 %) прийшли в охоту і були запліднені. Використання «Естрофану» забезпечило відновлення статевого циклу в 4 корів (40,0 %) із 10 простимульованих корів та, після штучного осіменіння, їх запліднення. Отже, ефективність препарату «Фоліген» на 35,0 % вище, порівняно з використаною (традиційною) схемою стимулювання репродуктивної функції корів. Аналіз витрат на виготовлення препарату «Фоліген» та порівняння цінової складової «Естрофану» свідчить, що вартість однієї дози розробленого препарату нижча на 14,8 грн. Відповідно, за однакової кратності введення (дворазового) препаратів, відновлення статевої функції однієї корови препаратом «Фоліген» дешевше на 29,6 грн.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі отримано нові дані про інтенсивність окиснювальних процесів, активність і вміст ізозимів лактат- і малатдегідрогеназ та ензимів антиоксидантного захисту, протеїнів (розчинних і структурних) гранульози та їх кореляції зі здатністю клітин утворювати стероїдні гормони. На основі культури клітин гранульози (середовища культивування) розроблений препарат у формі ліпосомальної емульсії для стимулювання репродуктивної функції корів.

1. Клітини гранульозного шару характеризуються дихальною активністю  $5,9 \pm 0,28$  нг-атом  $O_2$ /хв  $\times 0,1$  мл суспензії клітин (СК), відновною здатністю —  $4,3 \pm 0,19 K_3 [Fe(CN)_6]$ /хв  $\times 0,1$  мл СК, активністю ензимів (мкмоль / хв  $\times$  мг протеїну): лактат- і малатдегідрогеназ відповідно  $1,9 \pm 0,27$  та  $1,1 \pm 0,05$ , глутатіонпероксидази та каталази —  $0,61 \pm 0,06$  і  $0,39 \pm 0,02$ , супероксиддисмутази —  $12,4 \pm 0,74$  МО/мг протеїну, вмістом загального протеїну —  $15,2 \pm 1,04$  мг/мл, концентрацією гормонів (нмоль/л): тестостерону —  $1,9 \pm 0,49$ , естрадіолу —  $8,5 \pm 1,55$  і прогестерону —  $38,4 \pm 6,93$ .

2. Величини значень досліджених показників у клітинах не постійні, залежать від фізіологічного стану яєчника та розміру фолікулів, з яких вони отримані. Мінливість величин значень дихальної активності — 55,8 % ( $p < 0,001$ ), відновної здатності — 14,6 %, активності лактат- і малатдегідрогеназ відповідно 48,2 і 60,0 % ( $p < 0,001$ ), супероксиддисмутази — 55,5 % ( $p < 0,01$ ), глутатіонпероксидази — 89,7 % ( $p < 0,001$ ) і каталази — 39,3 % ( $p < 0,01$ ), вмісту загального протеїну — 34,2 %, концентрації гормонів: тестостерону — 67,6 % ( $p < 0,001$ ), естрадіолу — 43,7 % і прогестерону — 41,4 % ( $p < 0,01$ ).

3. У клітинах активність лактат- і малатдегідрогеназ забезпечують по 5 ізозимів, найвищий вміст яких відповідно ЛДГ1 (25,1 %) і ЛДГ2 (19,0 %), МДГ1 (16,3 %) та МДГ5 (30,2 %) характерний для культури гранульози з яєчників



## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**Матеріали та методи досліджень.** Дослідження проведені в лабораторії молекулярної біології та клінічної біохімії Інституту біології тварин НААН і на м'ясопереробних підприємствах: «Прикарпаття» й ТзОВ «Пустомитим'ясо» та СВК «Урожай». Для проведення досліджень після забою корів відбирали яєчники, оцінювали візуально за фізіологічним станом: зі «свіжою овуляцією» (n = 14), на місці овульованого фолікула є відтулина, жовте тіло відсутнє або діаметр до 5 мм, колір червоний (СО); з «раннім жовтим тілом» (n = 41), діаметр 10–20 мм, колір червоний або брунатний (РЖТ); з «пізнім жовтим тілом» (n = 32), діаметр 5–15 мм, колір жовтий (ПЖТ); «фолікулярного росту» (n = 84), без жовтого тіла (ФР).

Використовували яєчники корів з фолікулами малими (< 4 мм), середніми (4–7 мм) і великими (> 7 мм; Гузеватий Є. зі співавт., 1995). З фолікулів аспірацією отримували антральну рідину, центрифугували при 2000 об./хв, супернатант відділяли, а осад клітин суспендували в середовищах відповідно до об'єму фолікулярної рідини: Dulbeccos modified Eagle medium (DME), Basal Medium Eagle (BME) і RPMI-1640 з додаванням (мас.%): еструсної сироватки корів 8–12 %; фолікулярної рідини – 10–12 %, інсуліну (4 мкг/мл), гепарину (5 тис. од.) – 0,001 од./100мл. Культивували клітини гранульози в планшетах (діаметр лунок 3 см) протягом 38–40 діб при 5,0% CO<sub>2</sub>, 100% вологості і температурі 38,5 °С. Через кожні 7 діб проводили заміну 2/3 середовища. Загальна схема досліджень наведена на рис. 1.

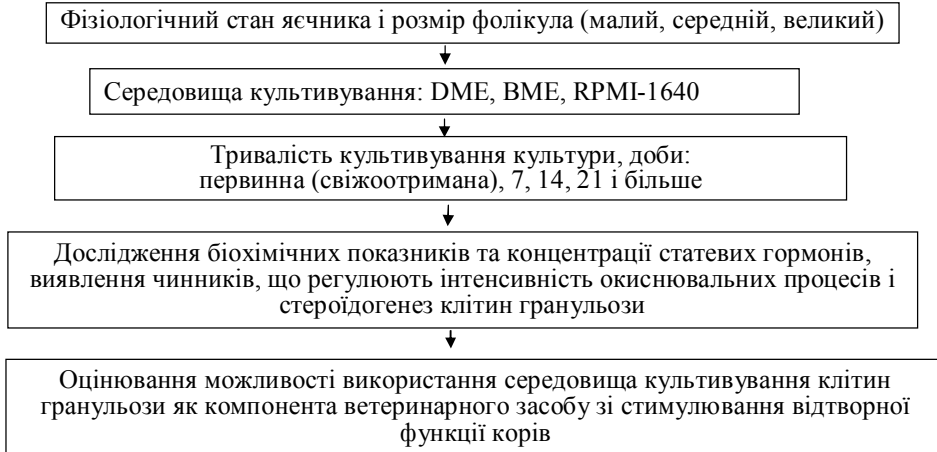


Рис. 1. Загальна схема досліджень

Матеріалом для біохімічних досліджень слугували клітини гранульозного шару фолікулів та середовища культивування. У первинній культурі гранульози та через 7, 14, 21 доби і більше (38–40 діб) культивування визначали: кількість клітин – підрахунком на сітці в камері Горяєва (10<sup>6</sup> клітин/мл); вміст загального протеїну методом Лоурі (Lowry O. H. et al., 1951); дихальну активність клітин –

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Боднар Ю. В.** Інтенсивність окисних процесів у клітинах гранульози при культивуванні / Ю. В. Боднар // Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького. — 2009. — Т. 11, №3(42), Ч. 2. — С. 11–14.

2. **Боднар Ю. В.** Окисно-відновні процеси у клітинах гранульози фолікулів яєчників корів за різного фізіологічного стану / Ю. В. Боднар, Д. Д. Остапів, Р. Г. Сачко, Ю. В. Мартин, О. С. Грабовська // Біологія тварин. — 2009. — Т. 11, № 1–2. — С. 316–321. (Дисертант визначила дихальну активність і відновну здатність клітин гранульози, статистично опрацювала дані, брала участь у написанні статті).

3. **Боднар Ю. В.** Особливості окисних процесів у клітинах гранульози при культивуванні / Ю. В. Боднар, Д. Д. Остапів, Р. Г. Сачко, О. С. Грабовська // Науково-технічний бюлетень Інституту біології тварин і Державного науково-дослідного контрольного інституту ветпрепаратів та кормових добавок. — Львів, 2010. — Вип. 11, № 1. — С. 18–23. (Дисертант дослідила окисні процеси за культивування клітин гранульози, проаналізувала отримані дані, брала участь у написанні статті).

4. **Боднар Ю. В.** Окисно-відновні процеси і концентрація гормонів за культивування гранульози / Ю. В. Боднар, Д. Д. Остапів, Р. Г. Сачко, С. Й. Кава / Біологія тварин. — 2014. — Вип. 15, № 1. — С. 17–22. (Дисертант дослідила інтенсивність споживання кисню і концентрацію стероїдних гормонів у гранульозі за культивування, брала участь у написанні статті).

5. **Боднар Ю. В.** Антиоксидантний захист та інтенсивність синтезу статевих гормонів за культивування клітин гранульозного шару фолікулів корів / Ю. В. Боднар, Н. В. Кузьміна, Р. Г. Сачко, Д. Д. Остапів // Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького. — Львів, 2014. — Т. 16, № 2(59). — С. 17–23. (Дисертант дослідила активність ензимів у клітинах гранульози та концентрацію статевих гормонів, брала участь у написанні статті).

6. **Боднар Ю. В.** Активність і вміст ізоформ лактатдегідрогенази за культивування клітин гранульозного шару фолікулів / Ю. В. Боднар, Н. В. Кузьміна, А. З. Пилипець, Р. Г. Сачко, Д. Д. Остапів // Науково-технічний бюлетень Інституту біології тварин і Державного науково-дослідного контрольного інституту ветпрепаратів та кормових добавок. — Львів, 2014. — Вип. 5, № 4. — С. 10–15. (Дисертант визначила активність лактатдегідрогенази, брала участь у написанні статті).

7. **Боднар Ю. В.** Активність і вміст ізоформ супероксиддисмутази за культивування клітин гранульози / Ю. В. Боднар, Н. В. Кузьміна, Р. Г. Сачко, Д. Д. Остапів // Науково-технічний бюлетень Інституту біології тварин і Державного науково-дослідного контрольного інституту ветпрепаратів та кормових добавок. — Львів, 2015. — Вип. 15, № 2, 3. — С. 16–22. (Дисертант визначила активність супероксиддисмутази, проаналізувала отримані дані).

8. **Kotsumbas I.** Oxidative processes in cow ovarian follicle layer granulosa cells at cultivation / I. Kotsumbas, J. Bodnar, D. Ostapiv, V. Vlizlo // Hungarian Veterinary J. — 2015. — Vol. 137, N 1. — P. 241–244. (Дисертант дослідила дихальну і відновну активності

гормони клітинами гранульозного шару фолікулів яєчників корів *in vitro* й обґрунтуванні можливості отримання сировини з гормональною активністю для виготовлення препарату зі стимулювання репродуктивної функції самок.

Для досягнення мети вирішували завдання:

- дослідити дихальну активність та відновну здатність клітин гранульози з фолікулів яєчників корів;
- визначити активність і вміст ізозимів окремих ензимів енергетичного обміну й антиоксидантного захисту клітин;
- вивчити вміст розчинних і структурних протеїнів клітин гранульозного шару вилучених з фолікулів яєчників корів;
- дослідити здатність клітин гранульози утворювати стероїдні гормони;
- вивчити кореляції між інтенсивністю окиснювально-відновних процесів, вмістом протеїнів і утворенням статевих гормонів клітинами;
- з'ясувати окремі чинники, що регулюють активність окиснювально-відновних процесів та утворення статевих гормонів клітинами гранульози;
- вивчити можливість використання середовища культивування клітин гранульози як компонента ветеринарного засобу зі стимулювання відтворної функції корів.

*Об'єкт дослідження* – окиснювально-відновні процеси та синтез стероїдних гормонів клітинами гранульозного шару фолікулів корів і способи їх коригування.

*Предмет дослідження* – дихальна активність і відновна здатність, активність і вміст ізозимів лактатдегідрогенази, малатдегідрогенази, супероксиддисмутази, глутатіонпероксидази, каталази, спектр розчинних і структурних протеїнів, концентрація стероїдних гормонів: тестостерону, естрадіолу та прогестерону.

*Методи дослідження* – біохімічні (спекрофотометричний, полярографічний, імуноферментний), фізіологічні (оцінювання фізіологічного стану яєчників, розміру фолікулів), мікроскопічний, статистичні.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Уперше проведено комплексні дослідження з характеристики окисно-відновних процесів у клітинах гранульозного шару фолікулів корів. Виявлені залежності між дихальною активністю, відновною здатністю, активністю та вмістом ізозимів лактат- і малатдегідрогеназ й здатністю клітин утворювати стероїдні гормони. З'ясовано особливості перебігу вільнорадикального окиснення за активністю і вмістом ізозимів ензимів антиоксидантного захисту та залежність від вказаного процесу утворення гранулозою статевих гормонів. Визначено вміст протеїнів (розчинних і структурних) у культурі клітин та виявлено кореляції величин їх значень зі здатністю утворювати стероїдні гормони гранулозою. Доведено, що інтенсивність окиснювально-відновних процесів і синтез гормонів клітинами залежать від тривалості культивування, кількості пасажів культури та субстратів у середовищі. Констатовано, що середовище за оптимальних умов культивування клітин гранульози містить високі концентрації стероїдних гормонів, що використано для виготовлення препарату зі стимулювання відтворювальної функції корів.

**Практичне значення отриманих результатів.** У результаті проведених досліджень отримано сировину (суміш середовищ культивування 7- і 14-добових культур клітин гранульози фолікулів яєчників корів) для виготовлення

пасажів культури та субстратів у середовищі. Результати експериментальних досліджень забезпечили отримання сировини для виготовлення ветеринарного препарату в 2–5 разів вищої концентрації статевих гормонів, ніж у первинній культурі клітин. На основі середовища культивування виготовлено препарат зі стимулювання репродуктивної функції корів, який містить середовище культивування клітин гранульози фолікулів яєчників корів у формі ліпосомальної емульсії.

**Ключові слова:** окиснювально-відновні процеси, ізозими, ензими, лактат- і малатдегідрогенази, антиоксидантний захист, протеїни, клітини гранульози, корови.

## АННОТАЦИЯ

**Боднар Ю. В. Активность окислительных процессов и продукция гормонов клетками гранулёзы яичников коров. — Рукопись.**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата сельскохозяйственных наук по специальности 03.00.04. – биохимия. – Институт биологии животных НААН, Львов, 2016.

Диссертация посвящена изучению дыхательной активности и восстановительной способности, активности и содержанию изозимов лактат- и малатдегидрогеназ, а также энзимов антиоксидантной защиты, протеинов (растворимых и структурных) клеток гранулёзного слоя фолликулов коров и их связи со способностью культуры гранулёзы синтезировать стероидные гормоны.

Комплексными исследованиями установлены особенности окислительно-восстановительных процессов в клетках гранулёзного слоя фолликулов коров, протекание которых зависит от физиологического состояния яичника и размера фолликулов, с которых они получены. Изменчивость величин значений дыхательной активности составляет 55,8 % ( $p < 0,001$ ), восстановительной способности – 14,6 %, активности лактат- и малатдегидрогеназ соответственно 48,2 и 60,0 % ( $p < 0,001$ ), супероксиддисмутазы – 55,5 % ( $p < 0,01$ ), глутатионпероксидазы – 89,7 % ( $p < 0,001$ ) и каталазы – 39,3 % ( $p < 0,01$ ), содержания общего белка – 34,2 %, концентрации гормонов: тестостерона – 67,6 % ( $p < 0,001$ ), эстрадиола – 43,7 % и прогестерона – 41,4 % ( $p < 0,01$ ). Доказано, что клетки *in vitro* образуют стероидные гормоны, а интенсивность стероидогенеза зависит от дыхательной активности, восстановительной способности, активности и содержания изозимов лактат- и малатдегидрогеназ гранулёзы. Наиболее существенная сила корреляции обнаружена относительно малатдегидрогеназы, которая положительно коррелирует с образованием тестостерона и эстрадиола (соответственно,  $\eta = 0,700$  и  $0,802$ ). Обнаружены особенности протекания свободнорадикального окисления по активности и содержанию изозимов энзимов антиоксидантной защиты и зависимость от этого процесса образования половых гормонов гранулёзой. Установлено, что содержание S2-изозима супероксиддисмутазы положительно коррелирует с концентрацией тестостерона ( $\eta = 0,715$ ).