

АКТИВНІСТЬ І ВМІСТ ІЗОФОРМ ЛАКТАТДЕГІДРОГЕНАЗИ ЗА КУЛЬТИВУВАННЯ КЛІТИН ГРАНУЛЬОЗНОГО ШАРУ ФОЛІКУЛІВ ЯЄЧНИКІВ КОРІВ

Ю. В. Боднар, Н. В. Кузьміна, А. З. Пилипець, Р. Г. Сачко, Д. Д. Остапів

Інститут біології тварин НААН

Вивчали активність та вміст ізоформ лактатдегідрогенази (ЛДГ) в клітинах гранульозного шару з фолікулів яєчників корів за тривалого культивування. Встановлено, що культура клітин гранульози характеризується активністю ЛДГ — $2,0 \pm 0,19$ мкмоль НАДН/хв \times мг білка ($1,7 \pm 0,44$ — $2,2 \pm 0,30$ мкмоль НАДН/хв \times мг білка). Активність ЛДГ у культурі клітин гранульози забезпечують 5 ізозимів ензиму. Активність ензиму й вміст ізоформ залежить від фізіологічного стану яєчників, із фолікулів яких вилучені клітини. Досліджувані показники характеризують напруженість енергетичного метаболізму в клітинах і пріоритети використання цукрів анаеробним і аеробним шляхами для ресинтезу АТФ. Збільшення вмісту ЛДГ1 і ЛДГ2 ізозимів ЛДГ й активування аеробного шляху використання цукрів із перетворенням лактату в піруват супроводжується підвищеним утворенням прогестерону у культурі клітин гранульози. Максимальний синтез прогестерону ($49,4 \pm 10,46$ нмоль/л) характерний для культури клітин гранульози з фолікулів статевої залози «пізнього жовтого тіла».

Клітини гранульозного шару фолікулів, забезпечуючи існування й дозрівання ооцитів, здатні використовувати та перетворювати субстрати і синтезувати статеві гормони. Гранульоза як *in vivo*, так й *in vitro* використовує глюкозу й засвоює амінокислоти, проявляє характерні, залежні від субстратів окиснення, дихальну і відновну активності, ресинтезує АТФ [1–4]. Одним із факторів, що визначає особливості метаболізму клітин є фізіологічний стан яєчника і розмір фолікулів, з яких вилучена гранульоза [5]. Крім того, за культивування клітин, присутності тих чи інших субстратів, змінюються метаболічна активність гранульози, здатність утворювати гормони. Одним із ключових ензимів, який може характеризувати метаболічну і енергогенеруючу здатність клітин гранульози є лактатдегідрогеназа (L-лактат:НАД-оксидоредуктаза, К.Ф. 1.1.1.27), кінцева ланка окиснення глюкози анаеробним шляхом і перша — у перетворенні лактату в піруват, який, своєю чергою, використовується в ЦТК.

Мета роботи — вивчити активність і вміст ізоформ лактатдегідрогенази (ЛДГ) та концентрацію статевих гормонів у культурі клітин гранульозного шару фолікулів корів.

Матеріали і методи. Для досліджень підібрані корови-аналоги за породою, віком, живою масою та клінічним станом. Після забою корів відібрані яєчники різного фізіологічного стану: фолікулярного зростання (без жовтого тіла); зі свіжою овуляцією (на місці фолікула є відтулина, жовте тіло відсутнє або червоного кольору, діаметром до 0,5 см); з раннім жовтим тілом (червоного або брунатного кольору, діаметром 1,0–2,0 см); з пізнім жовтим тілом (жовтого кольору, діаметром 0,5–1,5 см) [6]. Для досліджень використані яєчники з фолікулами розміром до 4 мм (малі), 4–7 мм (середні) і понад 7 мм (великі). Антральну рідину аспірували із фолікулів, центрифугувати при 2000 об./хв., супернатант відділяти, а осад клітин суспендувати у середовищах культивування клітин. Культивували гранульозу у середовищах: Dulbeccos modified Eagle medium (ДМЕ) Basal Medium Eagle (ВМЕ) і RPMI-1640 з додаванням (в мас. %): еструсної сироватки корів 8–12 %; фолікулярної рідини — 10–12 %, гепарин (5 тис. од.) — 0,0005–0,0015) у планшетах (діаметр лунок 3 см)

протягом 90–97 діб у герметично закритому ексикаторі при 100 % вологості і температурі 38,5 °С. Через кожні 7 діб проводили заміну 2/3 середовища.

Вивчали: активність ЛДГ визначали за швидкістю окиснення НАДН (мкмоль НАДН/хв×мг білка) [7] та її ізономи електрофорезом у 7,5 % поліакриламідному гелі (ПААГ). Після електрофорезу фарбували ПААГ: інкубували 60 хв. у темноті при температурі 37 °С в інкубаційному середовищі: 0,1 мг/мл ФМС, 0,2 М лактату, 0,5 мг/мл НАД⁺ та 0,5 мг/мл НСТ в 0,1 М Трис-НСІ буфері (рН 8,5). В місцях локалізації ензиму гель набуває фіолетового забарвлення [8]. Як маркер ізоензимного складу використані гемолізати еритроцитів крові корів. Крім того, досліджували інтенсивність синтезу гормонів культурою гранульози (тестостерону, прогестерону і естрадіолу; нМоль/л), концентрацію яких визначали імуноферментним аналізатором (Stat Fax 3000) та наборів реактивів фірми "DRG" відповідно до інструкції використання тест-систем. Статистичний аналіз отриманих результатів проведено за М.О. Плохінським [9].

Результати й обговорення. При середній активності ЛДГ ($2,0 \pm 0,19$ мкмоль НАДН/хв×мг білка) у культурі гранульози вища величина значення у клітин із фолікулів яєчників «раннього жовтого тіла» ($2,2 \pm 0,30$ мкмоль НАДН/хв×мг білка), менша на 9,1 % — з «фолікулярного росту» і найнижча (на 22,8 %; $1,7 \pm 0,44$ мкмоль НАДН/хв×мг білка) — з «пізнього жовтого тіла». Активність ЛДГ забезпечують ізономи, які відрізняються за рухливістю в електричному полі і поділяються на 5 основних каталітично активних протеїни — ЛДГ1, ЛДГ2, ЛДГ3, ЛДГ4 і ЛДГ5 (рис. 1).

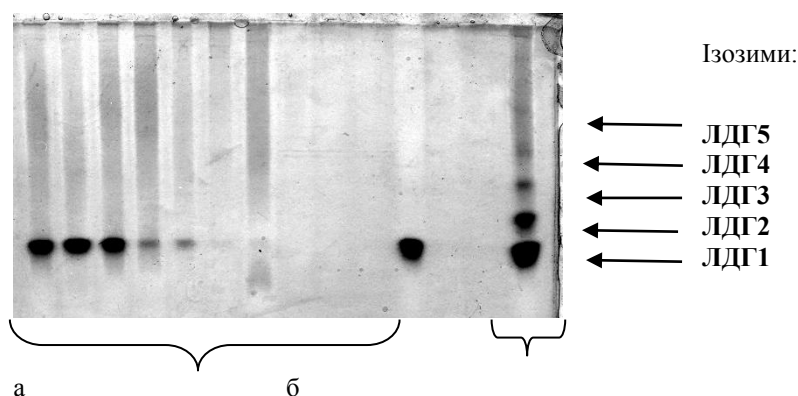


Рис. 1. Ізономи ЛДГ: а – культура клітин гранульози культивована впродовж 14 діб; б – гемолізати еритроцитів крові корів

Встановлено, що електрофореграми ізозимів відрізняються не тільки за швидкістю руху протеїнів в ПААГ, але й за інтенсивністю зафарбування і величиною (площею) смуг.

Виявлені відмінності ізозимів зумовлені фізіологічним станом яєчників з фолікулів яких отримані клітини для культивування. Зокрема, високий вміст ЛДГ5 ($21,7 \pm 2,33$ %) характерний для культури гранульози зі статевої залози «свіжої овуляції» і нижчий на 2,4–5,4 % для клітин з фолікулів інших фізіологічних станів яєчника (табл. 1). Аналогічно, ЛДГ4 найбільше у культурі клітин зі статевої залози «свіжої овуляції» ($23,7 \pm 5,21$ %), менше на 5,0–6,6 % з «раннього жовтого тіла» і «фолікулярного росту», а найнижчий вміст ($15,9 \pm 2,35$ %) за «пізнього жовтого тіла». Різниця між мінімальною і максимальною величинами значень становить 7,8 %.

Для культури гранульози з яєчника «раннього жовтого тіла» характерний високий вміст ЛДГ3 ($25,4 \pm 3,32$ %), на 5,4 % менший з «пізнього жовтого тіла» і «фолікулярного росту», а найменший ($16,3 \pm 3,57$ %) зі «свіжої овуляції».

Таблиця 1

Вміст ізозимів лактатдегідрогенази у культурі клітин гранульози, %

Ізозими ЛДГ	Фізіологічний стан яєчника							
	Свіжа овуляція		Раннє жовте тіло		Пізнє жовте тіло		Фолікулярний ріст	
	n	M±m	n	M±m	n	M±m	n	M±m
ЛДГ 5	3	21,7±2,33	11	17,9±3,14	14	19,3±3,44	96	17,3±0,94
ЛДГ 4	3	23,7±5,21	11	17,1±2,93	14	15,9±2,35	96	18,7±0,98
ЛДГ 3	3	16,3±3,57	11	25,4±3,32	14	20,0±2,72	96	20,0±0,95
ЛДГ 2	3	17,7±1,00	11	16,5±2,00	14	18,2±0,25	96	19,0±0,90
ЛДГ 1	3	20,3±2,60	11	23,4±2,62	11	26,9±3,59	14	25,1±1,44

Вміст ЛДГ2 у культурі гранульози, незалежно від фізіологічного стану яєчника, з фолікулів яких отримані клітини, становить 16,5–19,0 %, а різниця між величинами значень знаходиться в межах похибки середнього арифметичного.

Високий вміст ЛДГ1 (26,9±3,59 %) виявлено у інкубованих клітинах з фолікулів яєчників «пізнього жовтого тіла», менший на 1,8–3,5 % проявляється за «фолікулярного росту» і «раннього жовтого тіла», а найнижчий при вилученні й культивуванні гранульози з фолікулів статевої залози «свіжої овуляції» (20,3±2,60 %).

Аналіз вмісту ізоформ свідчить, що для клітин гранульози, які вилучені з фолікулів яєчників фізіологічного стану «пізнього жовтого тіла» і «фолікулярного росту», характерне перетворення лактату в піруват, стимулювання активності ЦТК та мітохондріального дихання (ЛДГ1+ЛДГ2 – 44,1 - 45,1 % проти ЛДГ4+ЛДГ5 – 35,2 – 36,0 %; рис. 2).

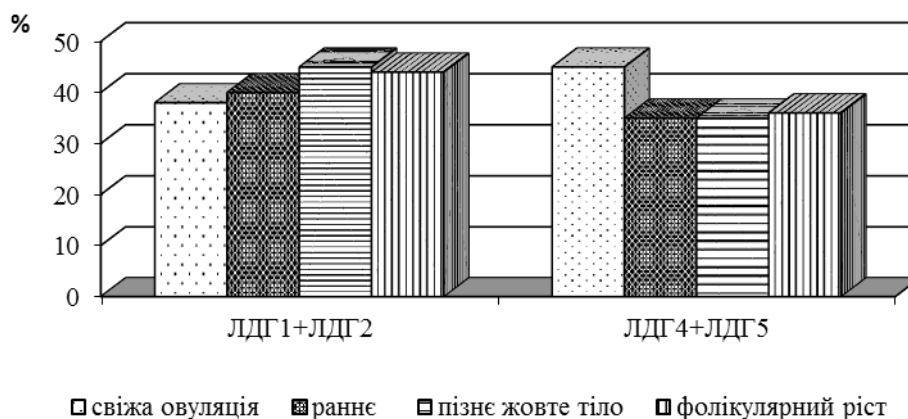


Рис. 2. Вміст ізозимів ЛДГ аеробного (ЛДГ1+ЛДГ2) і анаеробного (ЛДГ4+ЛДГ5) метаболізму клітин гранульози

І навпаки, у гарнульозі з фолікулів яєчника «свіжої овуляції» переважає нагромадження лактату, над використанням цукрів аеробним шляхом (ЛДГ4+ЛДГ5 — 45,4 % проти ЛДГ1+ЛДГ2 — 38,0 %).

Оцінювання інтенсивності утворення гранулозою статевих гормонів свідчить, що для клітин, вилучених з фолікулів яєчників «свіжої овуляції», характерне нагромадження в середовищі культивування прогестерону (43,0±8,46 нмоль/л) та низька концентрація естрадіолу (4,6±0,60 нмоль/л; табл. 2). Клітини з фолікулів статевої залози «раннього жовтого тіла» за культивування проявляють на 41,1 % (p < 0,05) вищу інтенсивність синтезу естрадіолу (7,8±1,50 нмоль/л), однак на 31,7 % знижують утворення прогестерону (29,4±5,21 нмоль/л).

Таблиця 2

Концентрація статевих гормонів у культурі клітин гранульози залежно від фізіологічного стану яєчника, нмоль/л

Досліджувані показники	Фізіологічний стан яєчника							
	Свіжа овуляція		Раннє жовте тіло		Пізнє жовте тіло		Фолікулярний ріст	
	n	M±m	n	M±m	n	M±m	n	M±m
Тестостерон	7	2,2±0,23	12	1,5±0,66	8	3,3±1,28	24	2,0±0,64
Естрадіол	11	4,6±0,60	33	7,8±1,50*	19	8,2±1,20*	38	8,2±1,60*
Прогестерон	10	43,0±8,46	33	29,4±5,21	19	49,4±10,46	38	33,9±6,88

Примітка: різниця статистично вірогідна, порівняно до мінімальної величини значення показника * - $p < 0,05$

Гранульоза, культивована з яєчників «пізнього жовтого тіла» і «фолікулярного росту», проявляє максимальну здатність утворювати естрадіол (8,2 нмоль/л), що вище на 44,0 % ($p < 0,05$) ніж за «свіжої овуляції». Одночасно, клітини з фолікулів статевих залоз «пізнього жовтого тіла» утворюють найбільше прогестерону (49,4±10,46 нмоль/л) і на 31,4 % менше з «фолікулярного росту».

Нагромадження тестостерону у середовищі культивування клітин, не залежно від фізіологічного стану яєчника, становить 1,5 – 3,3 нмоль/л, а різниця між величинами значень знаходиться в межах похибки середнього арифметичного.

В И С Н О В К И

1. Культура клітин гранульози характеризується активністю ЛДГ 2,0±0,19 мкмоль НАДН/хв×мг білка (1,7±0,44 – 2,2±0,30 мкмоль НАДН/хв×мг білка).

2. Активність ензиму в культурі клітин гранульози забезпечують 5 ізозимів, які залежно від рухливості в електричному полі поділяються на ЛДГ5, ЛДГ4, ЛДГ3, ЛДГ2 і ЛДГ1.

3. Активність ензиму й вміст ізоформ залежить від фізіологічного стану яєчників, з фолікулів яких вилучені клітини.

4. Вміст ізозимів ЛДГ характеризує напруженість енергетичного метаболізму в клітинах і пріоритети використання цукрів анаеробним чи аеробним шляхами для ресинтезу АТФ.

5. Збільшення вмісту ізозимів ЛДГ1 і ЛДГ2 й активування аеробного шляху використання цукрів з перетворенням лактату в піруват супроводжується підвищеним утворенням прогестерону в культурі клітин гранульози. Максимальний синтез прогестерону (49,4±10,46 нмоль/л) встановлено в культурі з фолікулів статевої залози «пізнього жовтого тіла».

Перспективи подальших досліджень. Дослідити залежність між активністю й вмістом ізоформ МДГ та інтенсивністю синтезу гранульозою статевих гормонів.

LACTATE DEHYDROGENASE ACTIVITY AND ISOFORM CONTENT WHEN COW OVARIAN FOLLICLE GRANULOSE CELL CULTIVATION

Yu. V. Bodnar, N. V. Kuzmina, A. Z. Pylypetc, R. G. Sachko, D. D. Ostapiv

Institute of Animal Biology of NAAS

S U M M A R Y

Activity and isoform content of lactate dehydrogenase (LDH) in cow ovarian follicle granulose cell layer with long term incubation. It is set, that cell culture characterizes by LDH

activity – $2,0 \pm 0,19 \mu\text{mol NADH}/\text{min} \times \text{mg}$ of protein ($1,7 \pm 0,44 - 2,2 \pm 0,30 \mu\text{mol NADH}/\text{min} \times \text{mg}$ of protein). Activity of lactate dehydrogenase in granulose cell culture is ensured by 5 isozymes of enzyme. Enzymatic activity and isoform content depends on ovarian physiological state, from where follicles were extirpated. Studied indexes characterizes tension of energetic metabolism in cells and priority of carbohydrate usage anaerobic and aerobic ways for ATP re-synthesis. Content increase of isozymes LDH1 and LDH2 lactate dehydrogenase and activating of aerobic pathway of carbohydrate usage with conversion of lactate to piruvate, this is followed by increasing in progesterone synthesis in granulose culture cell. Maximal progesterone synthesis ($49,4 \pm 10,46 \text{ nmol/L}$) is normal for follicle granulose cell culture taken from «late corpora lutea».

АКТИВНОСТЬ И СОДЕРЖАНИЕ ИЗОФОРМ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ КЛЕТОК ГРАНУЛЕЗНОГО ШАРА Фолликулов ЯИЧНИКОВ КОРОВ

Ю. В. Боднар, Н. В. Кузьмина, А. З. Пилипец, Р. Г. Сачко, Д. Д. Остапив

Институт биологии животных НААН

А Н Н О Т А Ц И Я

Изучали активность и содержание изоформ лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в клетках гранулезного слоя фолликулов яичников коров при длительном культивировании. Установлено, что культура клеток гранулезы характеризуется активностью ЛДГ – $2,0 \pm 0,19 \text{ мкмоль НАДН}/\text{мин} \times \text{мг}$ белка ($1,7 \pm 0,44 - 2,2 \pm 0,30 \text{ мкмоль НАДН}/\text{мин} \times \text{мг}$ белка). Активность лактатдегидрогеназы в культуре клеток гранулезы обеспечивают 5 изозимов энзима. Активность фермента и содержание изоформ зависит от физиологического состояния яичников, из фолликулов которых получены клетки. Исследуемые показатели характеризуют напряженность энергетического метаболизма в клетках и приоритеты использования сахаров анаэробным и аэробным путями для ресинтеза АТФ. Увеличение содержания ЛДГ1 и ЛДГ2 изозимов ЛДГ и активация аэробного пути использования сахаров с преобразованием лактата в пируват сопровождается повышенным концентрации прогестерона в культуре клеток гранулезы. Максимальный синтез прогестерона ($49,4 \pm 10,46 \text{ нмоль/л}$) характерен для культуры клеток гранулезы из фолликулов половой железы «позднего желтого тела».

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Cetica P. D.* Effect of lactate dehydrogenase activity and isoenzyme localization in bovine oocytes and utilization of oxidative substrates on in vitro maturation / P. D. Cetica, L. N. Pintos, G. C. Dalvit, M. T. Beconi // *Theriogenology*. — 1999. — Vol. 51. — 541–550.
2. *Boland N. I.* The effect of glucose metabolism on murine follicle development and steroidogenesis in vitro / N. I. Boland, P. G. Humpherson, H. J. Leese, R. G. Gosden // *Human Reproduction*. — 1994. — Vol. 9. — P. 617–623.
3. *Sugiura K.* Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: energy metabolism / K. Sugiura, F. L. Pendola, J. J. Eppig // *Developmental Biology*. — 2005. — Vol. 279. — P. 20–30.
4. *Debra A.* Impact of oxygen concentration on adult murine pre-antral follicle development in vitro and the corresponding metabolic profile / A. D. Gook, D. H. Edgar, K. Lewis, J. R. Sheedy // *Molecular Human Reproduction*. — 2014. — Vol. 20. — P. 31–41.
5. *Ying Shijia.* Effect of different levels of short-term feed intake on folliculogenesis and follicular fluid and plasma concentrations of lactate dehydrogenase, glucose, and hormones in Hu

sheep during the luteal phase / [S. Ying](#), [Z. Wang](#), [C. Wang](#) et al. // *Reproduction*. — 2011. — Vol. **142**. — P. 699–710.

6. *Гузеватий О. Є.* Оцінка функціонального стану ооцит-кумулюсних комплексів корів залежно від типу яєчника / О. Є. Гузеватий, В. В. Ясінський, Л. В. Смудка та ін. // *Вісник аграрної науки*. — 1995. — № 11. — С. 94–98.

7. *Практическое руководство по энзимологии*. — М.: Высшая школа. — 1980.— 380 с.

8. *Гааль Э.* Электрофорез в разделении биологических макромолекул / Э. Гааль, Г. Медьеши, Л. Верецки. — М: Мир, — 1982. — С. 446.

9. *Плохинский Н. А.* Биометрия. / Н. А. Плохинский — М.: МГУ. — 1970. — С. 53–60.