УДК 661. 185.1: 599. 323.4:612. 35: 57. 015.2

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

Інститут біології тварин УААН

Наведено зв'язок між фізіологічним станом яєчників, величиною фолікулів та інтенсивністю дихання і відновною здатністю клітин гранульози. Встановлено, що споживання кисню та відновна здатність клітин гранульози залежить від фізіологічного стану яєчника і величини фолікулів, з яких вони отримані. У фолікулах яєчників корів, у залежності від розміру і фізіологічного стану статевої залози, існує дефіцит акцепторів електронів, що свідчить про різну метаболічну активність клітин гранульози та якість ооцитів.

Ключові слова: ДИХАЛЬНА АКТИВНІСТЬ, ВІДНОВНА ЗДАТНІСТЬ, ГРАНУЛЬОЗА, ФОЛІКУЛ, ЯЄЧНИК, КОРОВИ.

Ріст і розвиток фолікула та дозрівання ооцитів тісно пов'язані з інтенсивністю окисних процесів, що протікають у структурах фолікула (клітинах гранульозного шару і ооцитах). Встановлено, що інтенсивність кровообігу і постачання кисню до яєчника, які залежать від фізіологічного стану статевої залози, впливають на метаболічну активність клітин гранульози [1] і, як наслідок, на розвиток ооцитів [2]. Перевага синтезу АТФ аеробним шляхом забезпечує кращий розвиток ооцитів і зигот in vivo та in vitro [3, 4]. При тому, клітини гранульози відіграють важливу роль у регуляції як окисно-відновних, так і інших метаболічних процесів ооцита, яєчника й в цілому репродуктивної функції самок. Так, гранульоза забезпечує статеві клітини субстратами окиснення і захищає їх від цитотоксичних впливів [5, 6], регулює pH ооцита [7], а інтенсивність синтезу естрадіолу є одною з детермінант росту та утворення домінуючого фолікула і овуляції у корів [8]. Метою роботи було вивчити зв'язки між фізіологічним станом яєчника, розміром фолікулів та інтенсивністю окисно-відновних процесів у клітинах гранульози.

Матеріали і методи

Після забою корів отримували клітини гранульози з фолікулів яєчників за різного фізіологічного стану [9]: «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). Для досліджень використовували яєчники з фолікулами розміром до 4 мм (малі), 4–7 мм (середні) і понад 7 мм (великі). Антральну рідину отримували шляхом аспірації фолікулів, центрифугували при 2000 об/хв, супернатант відділяли, а осад клітин суспендували в середовищі Basal Medium Eagle (BME; Sigma), об'єм якого відповідав об'єму фолікулярної рідини.

У суспензії клітин гранульози визначали інтенсивність поглинання кисню — полярографічно (нг-атом О/0,1 мл суспензії клітин (СК)/хв), відновну здатність — потенціометрично (мВ/0,1мл СК/хв). Дослідження проводили за температури 38 °С у BME.

З метою виявлення особливостей окисних процесів у клітинах гранульози до середовища додавали зовнішньоклітинний акцептор електронів — ферриціанід калію ($K_3[Fe(CN)_6]$) [10]. Аналіз результатів досліджень провели за М. О. Плохінським (1969) [11].

Результати й обговорення

Дихальна активність клітин гранульози після вилучення з фолікулів у ВМЕ становить 3,5 ± 0,50 нг-атом О/0,1 мл СК/хв, відновна — 3,2 ± 0,80 мВ/0,1мл СК/хв. При цьому, виявлені коливання дихальної активності (CV 84,8) й відновної здатності (CV 77,3) клітин. Аналіз отриманих результатів показав, що варіабельність цих показників значною мірою зумовлена фізіологічним станом яєчників. Так, високий рівень споживання кисню характерний для клітин гранульози з фолікулів яєчника «свіжої овуляції» — 3,9 ± 0,50 нг-атом О/0,1 мл СК/хв, нижчий на 5,4 % — «пізнього» жовтого тіла та на 11,1 % — «фолікулярного зростання» і ще нижчий — на 25,8 % з фолікулів статевої залози «раннього» жовтого тіла (рис. 1).

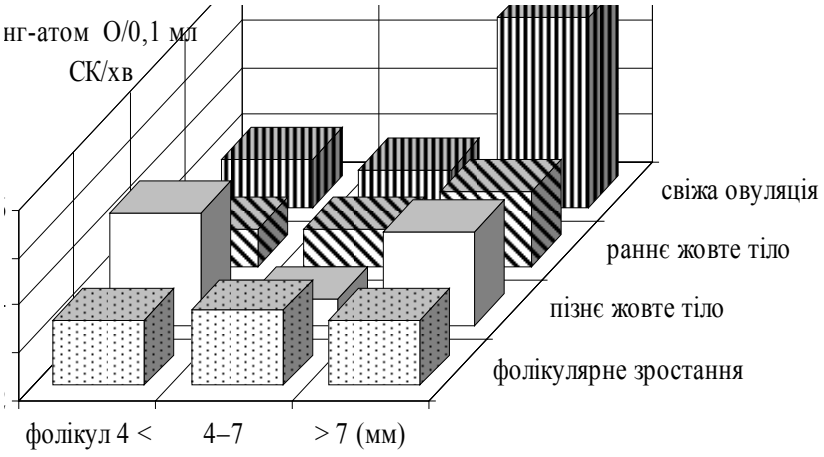

Рис. 1. Дихальна активність клітин гранульози за різного фізіологічного стану яєчника та розміру фолікула

Аналогічні різниці виявлені й у відновній здатності гранульози, високі значення якої у клітин з фолікулів яєчників «свіжої овуляції» та «раннього» жовтого тіла (відповідно, 3,6 та 3,8 мВ/0,1мл СК/хв) і нижче, порівняно з максимумом, на 31,0 та 58,3 % (0,7 та 1,4 мВ/0,1 мл СК/хв) — статевих залоз, відповідно, «пізнього» жовтого тіла та «фолікулярного зростання» (рис. 2).

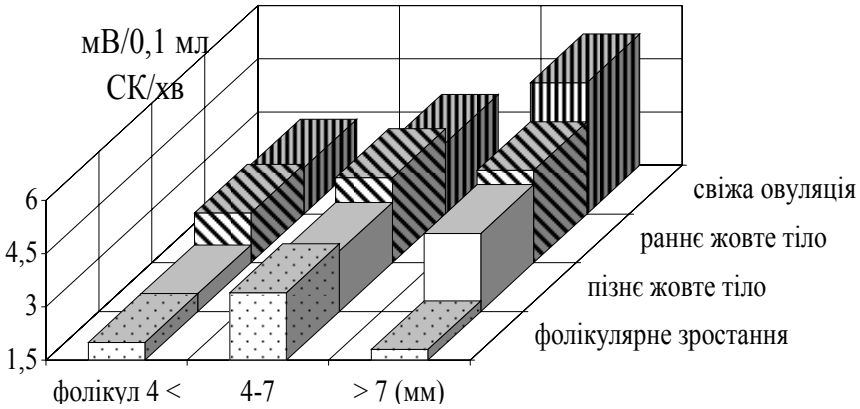

Рис. 2. Відновна здатність клітин гранульози за різного фізіологічного стану яєчника та розміру фолікула

Отже, у гранульозі фолікулів яєчника «свіжої овуляції» інтенсивно протікають окисні процеси, що може бути зумовлене апоптозом клітин, атрезією фолікулів й підготовкою статевої залози до розвитку жовтого тіла.

Крім залежності досліджуваних показників від фізіологічного стану яєчника, на споживання кисню та відновну здатність гранульози впливає також розмір фолікула. Так, максимальна дихальна активність характерна для клітин великого фолікула яєчника «свіжої овуляції» (6,0 ± 0,79 нг-атом О/0,1 мл СК/хв) і нижча у два рази (2,8–3,0 нг-атом О/0,1 мл СК/хв) — для середнього та малого. При цьому, гранульоза з великого фолікула виявляє також високу відновну здатність (5,2 ± 1,07 мВ/0,1мл СК/хв), а з середнього та малого — нижчу, відповідно, на 32,7 та 46,2 %.

Отже, виявлені вище споживання кисню та відновна здатність клітин гранульози у великому фолікулі (фолікул, що росте; вторинний) яєчника «свіжої овуляції», після овуляції домінуючого, може характеризувати фізіологічну особливість статевого циклу корів. Відомо, що еструсний цикл у більшості корів (більше 95 %) характеризується двома–трьома хвилями зростання [12]. Отже, після овуляції (або після вилучення з фолікула ооцита) вторинний фолікул може або розвиватися, або ж піддаватися атрезії. Тобто, збільшення споживання кисню та відновної здатності клітинами гранульози може бути зумовлено як їх ростом, так і апоптозом, з наступною атрезією фолікула [13]. При фізіологічному перебігу еструсного циклу (одній хвилі зростання) вторинний фолікул піддається атрезії [14].

У клітинах гранульози з малого і середнього фолікулів яєчника «раннього» жовтого тіла дихальна активність однакова (2,8 нг-атом О/0,1 мл СК/хв) і вища на 28,5 % з великого. Відновна здатність клітин гранульози за вказаного фізіологічного стану яєчника зі збільшенням розміру фолікула підвищується: у малому становить 2,9 ± 0,41 мВ/0,1 мл СК/хв, у середньому збільшується на 34,4 % у великому — максимальна (4,1 ± 1,03 мВ/0,1 мл СК/хв). Тобто, паралельно з розвитком жовтого тіла, клітини гранульози великого фолікула, порівняно з малим та середнім, яєчника «раннього» жовтого тіла у більшій мірі використовують кисень і постачають електрони у позаклітинний простір.

У яєчнику «пізнього» жовтого тіла дихальна активність клітин гранульози у великому та малому фолікулі вища (4,0–4,4 нг-атом О/0,1 мл СК/хв), ніж у середньому (2,6 ± 0,28 нг-атом О/0,1 мл СК/хв). При цьому, відновна здатність клітин зі збільшенням розміру фолікула зростає: 2,0 ± 0,74 — у малому, 3,2 ± 1,20 — у середньому і 3,7 ± 0,24 мВ/0,1мл СК/хв — у великому. Виявлені зміни дихальної активності і відновної здатності клітин гранульози залежно від розміру фолікула яєчника «пізнього» жовтого тіла свідчать про різний ступінь розвитку ооцитів і, відповідно, неоднакову потребу в енергетичних і пластичних матеріалах.

Клітини гранульози малого та великого фолікулів яєчника «фолікулярного зростання» проявляють однакову дихальну активність (3,4 нг-атом О/0,1 мл СК/хв) і вищу на 5,9 % — середнього. Аналогічно, відновна здатність клітин малого та великого фолікулів майже однакова (1,8–2,0 мВ/0,1мл СК/хв) і вища на 70,0–88,9 % з середнього.

Отже, у великому фолікулі яєчника «фолікулярного зростання» процеси як генерації, так і використання енергетичних субстратів клітинами гранульози сповільнені, що може бути зумовлено завершенням розвитку фолікула і дозрівання ооцита (у випадку одної хвилі зростання фолікулів). Вищі значення досліджених показників у середньому фолікулі вказаного фізіологічного стану статевої залози можуть бути зумовлені, з одного боку, забезпеченням клітинами гранульози росту ооцита (у випадку двох хвиль зростання з атрезією домінуючого фолікула), з другого — апоптозом клітин. Зниження дихальної активності і відновної здатності клітин гранульози малого фолікула, на нашу думку, зумовлено впливом домінуючого фолікула.

Додавання у середовище визначення ферриціаніду калію, як позаклітинного акцептора електронів, призводить до змін інтенсивності споживання кисню та відновної здатності клітин гранульози. Зокрема, інтенсивне дихання виявлено у клітин яєчника

«фолікулярного зростання» (3,9 ± 0,65 нг-атом О/0,1 мл СК/хв), нижче на 2,6 % — з фолікулів «раннього» жовтого тіла і найнижче — зі статевих залоз «свіжої овуляції» та «пізнього» жовтого тіла (8,3 %; 3,6 нг-атом О/0,1 мл СК/хв) (рис. 3).

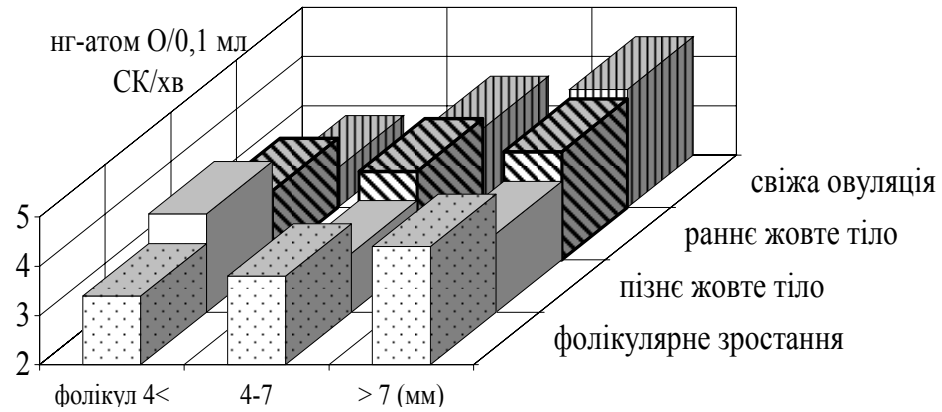

Рис. 3. Дихальна активність клітин гранульози у присутності зовнішньоклітинного акцептора електронів

Відновна здатність у присутності акцептора електронів найвища у клітин гранульози фолікулів яєчника «раннього» жовтого тіла (3,9 ± 1,18 мВ/0,1мл СК/хв), нижча на 14,7–21,8 % — з «пізнього» жовтого тіла та «фолікулярного зростання» і найнижча — зі «свіжої овуляції» (2,5 ± 0,92 мВ/0,1мл СК/хв) (рис. 4).

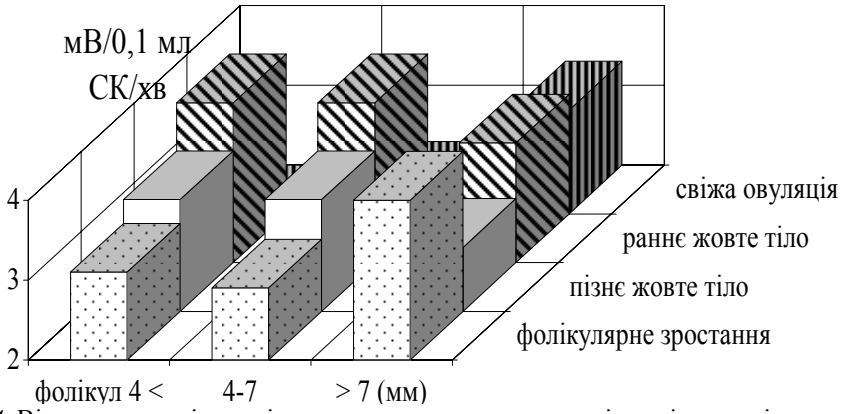

Рис. 4. Відновна здатність клітин гранульози у присутності зовнішньоклітинного акцептора електронів

Отже, у фолікулах яєчників, у залежності від фізіологічного стану, в більшій або меншій мірі, існує дефіцит акцепторів електронів, зокрема кисню. Встановлена залежність зумовлена інтенсивним метаболізмом клітин гранульози й визначається ступенем зрілості ооцита. Дефіцит кисню призводить до нагромадження в антральній рідині недоокиснених продуктів і, відповідно, гальмування метаболізму клітин гранульози і ооцитів. Вказані зміни призводять до апоптозу клітин і атрезії фолікулів і, як наслідок, до порушення статевих циклів у корів.

Наявність зовнішньоклітинного акцептора електронів — ферриціаніда калію, змінює інтенсивність окисних процесів у клітинах гранульози не тільки залежно від фізіологічного стану яєчника, але й від розміру фолікула. Зокрема, у яєчнику «фолікулярного зростання» зі збільшенням розміру фолікула споживання кисню гранульозою пропорційно зростає: низьке (3,4 ± 0,48 нг-атом О/0,1 мл СК/хв) у малому, вище на 11,7 % — у середньому і максимальне (4,4 ± 0,48 нг-атом О/0,1 мл СК/хв) — у великому. Пряма залежність дихальної активності клітин гранульози від розміру фолікула виявлена також у яєчниках «раннього» жовтого тіла та «свіжої овуляції»: високе значення досліджуваного показника (4,2 ± 0,48 та 4,4 ± 0,63 нг-атом О/0,1 мл СК/хв) встановлене у великому фолікулі, нижче на 10,5 та 22,2 % у середньому і ще нижче на 23,5 та 57,1 % у малому, відповідно. На противагу, в яєчнику

«пізнього» жовтого тіла дихальна активність гранульози найвища у малому фолікулі (4,0 ± 0,43 нг-атом О/0,1 мл СК/хв) і нижча на 25,0 % у середньому та на 11,1 % у великому фолікулах.

Відновна здатність клітин гранульози при додаванні до середовища позаклітинного акцептора у малому і середньому фолікулах яєчника «фолікулярного зростання» однакова (2,9–3,1 мВ/0,1мл СК/хв), а у великому — вища на 32,2–41,3 %. На противагу, у яєчнику «пізнього» жовтого тіла, у клітин гранульози з малого і середнього фолікулів, відновна здатність однакова (3,4 мВ/0,1мл СК/хв), а у великому — нижча на 21,4 %.

Відновна здатність клітин гранульози яєчника «раннього» жовтого тіла характеризується оберненою залежністю від розміру фолікула: найменша величина (3,5 ± 1,54 мВ/0,1мл СК/хв) виявлена у великому фолікулі, а найбільша — у малому (4,3 ± 0,97 мВ/0,1мл СК/хв).

У клітин гранульози яєчника «свіжої овуляції» зі збільшенням розміру фолікула відновна здатність зростає з 1,9 ± 0,57 мВ/0,1мл СК/хв у малому, на 21,0 % — у середньому і на 73,7 % — у великому.

Пропорційність змін дихальної активності клітин гранульози зі збільшенням розміру фолікулів (у присутності акцептора електронів) фізіологічно визначена. Відомо, що ооцити фолікулів з вищим вмістом розчиненого O_2 у фолікулярній рідині, краще дозрівають, а після запліднення інтенсивніше розвиваються до 6–8-клітинних стадій, ніж статеві клітини фолікулів з меншими величинами показника насиченості кисню [15, 16]. Тобто, вища дихальна активність клітин гранульози у великому фолікулі яєчника «фолікулярного зростання» свідчить про потреби ооцита домінуючого фолікула в субстратах для повноцінного дозрівання, підготовку до овуляції і запліднення статевої клітини. У фолікулах при гіпоксії, а, отже, й за низької дихальної активності клітин гранульози, якість ооцитів понижена [17]. При цьому, нагромадження електронів у порожнині фолікула, можливо, зумовлено дефіцитом та доступністю альтернативних акцепторів (кисню), а також рівнем метаболічних процесів, які забезпечують потреби ооцита в енергетичних та пластичних компонентах [18].

Висновки

1. Інтенсивність споживання кисню та відновна здатність клітин гранульози залежить від фізіологічного стану яєчника і величини фолікулів, з яких вони отримані.
2. У фолікулах яєчників корів, у залежності від розміру і фізіологічного стану статевої залози, існує дефіцит акцепторів електронів, що свідчить про різну метаболічну активність клітин гранульози та якість ооцитів.

Перспективи подальших досліджень. Буде проведено вивчення особливостей окисно-відновних процесів ланцюга дихання клітин гранульози фолікулів яєчників у корів.

J. Bodnar, D. Ostapiv, R. Sachko, J. Martyn, O. Grabovska

OXIDE AND RESTORATION PROCESSES IN THE CELLS OF GRANULOSE FOLLICLES OF COWS OVARIES DEPEND ON THE PHYSIOLOGICAL STATE

S u m m a r y

The bonds between physiological state of ovaries, the size of follicles, the intensity of breathing and the restoration ability of cells of granulose were studied. We provide evidence that the intensity of oxygen consumption and the restoration ability of cells of granulose depends on the physiological state of ovary and the size of follicles, which they were received from. In the follicles

of ovaries of cows, depending on the size and the physiological state of sexual gland, there is a deficit of electron acceptors, which show different metabolite activity of cells of granulose and quality of oocites.

Ю. В. Боднар, Д. Д. Остапив, Р. Г. Сачко, Ю. В. Мартын, А. С. Грабовская

ОКИСЛИТЕЛЬН0-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ В КЛЕТКАХ ГРАНУЛЁЗЫ ФОЛЛИКУЛОВ ЯИЧНИКОВ КОРОВ

А н н о т а ц и я

Приведена связь между физиологическим состоянием яичников, величиной фолликулов и интенсивностью дыхания и восстановительной способностью клеток гранулезы. Установлено, что потребление кислорода и восстановительная способность клеток гранулезы зависит от физиологического состояния яичника и величины фолликулов, с которых они получены. В фолликулах яичников коров, в зависимости от размера и физиологического состояния половой железы, существует дефицит акцепторов электронов, что свидетельствует о разной метаболической активности клеток гранулезы и качества ооцитов.

1. *Смирнова Т. А.* Состояние ядерного материала ооцитов коров в зависимости от развития микроцеркулярного русла фолликулов / Смирнова Т. А., Галиева Л. Д. // Бюл. ВНИИ разведения и генетики с.-х. животных. — 1998. — Вып. 109. — С. 21–22.
2. *Chui D. K.* Follicular vascularity — the predictive value of transvaginal power Doppler ultrasonography in an in-vitro fertilization programme : a preliminary study / Chui D. K., Pugh N. D., Walker S. M. // Hum. Reprod. — 1997. — V. 12. — P. 191–196.
3. *Cetica P. D.* Effect of lactate dehydrogenase activity and isoenzyme localization in bovine oocytes and utilization of oxidative substrates on in vitro maturation / Cetica P. D., Pintos L. N., Dalvit G. C. // Theriogenology. — 1999. — V. 51. — P. 541–550.
4. *Geshi M.* Effects of Sodium Pyruvate in Nonserum Maturation Medium on Maturation, Fertilization, and Subsequent Development of Bovine Oocytes With or Without Cumulus Cells / Geshi M., Takenouchi N., Yamauchi N. // Biol. Reprod. — 2000. — V.63. — P. 1730–1734.
5. *Houghtona F. D.* Functional Significance of Gap Junctional Coupling in Preimplantation Development / F. D. Houghtona, K. J. Barra, G. Walterd, H.-D. Gabrield et al. // Biol. Reprod. — 2002. — V. 66. — P. 1403–1412.,
6. *Hashimoto S.* Excessive concentration of glucose during in vitro maturation impairs the developmental competence of bovine oocytes after in vitro fertilization: relevance to intracellular reactive oxygen species and glutathione contents / Hashimoto S., Minami N., Yamada M. // Mol. Reprod. Dev. — 2000. — V. 56. — P. 520–526.
7. *Harris G. F.* Granulosa cells regulate intracellular pH of the murine growing oocyte via gap junctions: development of independent homeostasis during oocyte growth / Harris G. F., Baltz J. M. // Development. — 2006. — V. 133. — P. 591–599.
8. *Kawashima C.* Relationship between metabolic hormones and ovulation of dominant follicle during the first follicular wave post-partum in high-producing dairy cows. // Kawashima C., Fukihara S., Maeda M. et all // Reproduction. — 2007. — V. 133. — P. 155–163.
9. *Гузєватий О. Є.* Оцінка функціонального стану ооцит-кумулюсних комплексів корів залежно від типу яєчника / О. Є. Гузєватий, В. В Ясінський, Л. В. Смулка та ін. // Вісник аграрної науки. — 1995. — № 11. — С. 94–98.

10. *Штольц К. Ф.* Амперометрическое определение ферроцианида в присутствии субклеточных структур / Штольц К. Ф., И. М. Мосолова, Л. А. Дронова. // Биохимические методы. — М. : Наука, 1980. — С. 147–150.

11. *Плохинский Н. А.* Руководство по биометрии для зоотехников. / Плохинский Н. А. — М. : Колос., 1969. — 255 с.

12. *Adams G. P.* Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants / Adams G. P. // J Reprod Fertil Suppl. — 1999. — V. 54. — P 17–32.

13. *Tilly J. L.* Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive. / Tilly J. L. // Nat Rev Mol Cell Biol. — 2001. — V. 2. — P. 838–884

14. *Butler S. T.* Energy Balance, Metabolic Status and the First Postpartum Ovarian Follicle Wave in Cows Administered Propylene Glycol / Butler S. T., Pelton S. H., Butler W. R. // J. Dairy Sci. — 2006. — V. 89. — P. 2938–2951.

15. *Krisher R. L.* Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultured in semi-defined and defined culture media. / Krisher R. L., Lane M., Bavister B. D. // Biol. Reprod. — 1999. — V. 60. — P. 1345–1352.

16. *Van Blerkom J.* The developmental potential of the human oocyte is related to the dissolved oxygen content of follicular fluid: association with vascular endothelial growth factor levels and perifollicular blood flow characteristics / Van Blerkom J., Antczak M., Schrader R. // Hum. Reprod. — 1997. — V. 2. — P. 1047–1055.

17. *Banwell K. M.* Oxygen concentration during mouse oocyte in vitro maturation affects embryo and fetal development / K. M. Banwell, M. Lane, D. L. Russell et all // Human Reproduction. — 2007. — V. 22(10). — P. 2768–2775.

18. *Krisher R. L.* Enhanced glycolysis after maturation of bovine oocytes in vitro is associated with increased developmental competence / Krisher R. L., Bavister B. D. // Mol. Reprod. Dev. — 1999. — V. 53. — P. 19–26.

Рецензент: головний науковий співробітник Інституту біології тварин УААН, доктор біологічних наук, професор В. Г. Янович.