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

ОСОБЛИВОСТІ ОКИСНИХ ПРОЦЕСІВ У КЛІТИНАХ ГРАНУЛЬОЗИ ПРИ КУЛЬТИВУВАННІ

Ю. В. Боднар, Д. Д. Остапів, Р. Г. Сачко, О. С. Грабовська, Р. Д. Остапів

Інститут біології тварин НААНУ

Вивчали особливості окисних процесів клітин гранульози фолікулів яєчників корів у зв'язку з тривалістю культивування. Встановлено, що інтенсивність споживання оксигену та відновна здатність клітин гранульози зростають через 48 год інкубування. При цьому, підвищується активність аеробного гліколізу та інтенсивність немітохондрійних окисних процесів зі зниженням частки оксигену, яка використовується у вільнорадикальному окисненні ненасичених жирних кислот. Позаклітинний акцептор електронів нормалізує інтенсивність окисних процесів клітин при культивуванні. Активність НАД-залежної ділянки ланцюга дихання клітин гранульози проявляється через 96 год культивування, а цитохромоксидази — інгібується.

Ріст, розвиток і дозрівання фолікулів у яєчниках залежить від напруженості оксигену в організмі самок, а при культивуванні in vitro — від його концентрації у середовищах [1–3]. Це зумовлено тим, що оксиген стимулює окисне фосфорилювання та ресинтез АТФ в ооциті, забезпечуючи вищу інтенсивність дозрівання та кращу фізіологічну якість статевої клітини [4, 5]. У цьому процесі важливу роль відіграють клітини гранульози, які, оточуючи ооцит, формують «колиску», яка забезпечує статеві клітини не тільки субстратами, але й біологічно активними речовинами, захищає від цитотоксичних впливів [6, 7] та регулює внутрішньоклітинне pH [8]. При цьому, гранульоза забезпечує своє існування (ресинтез АТФ) гліколізом та диханням [4, 9]. In vitro в процесі культивування як ооцит-кумулюсних комплексів, так і клітин гранульози, інтенсивність ресинтезу АТФ змінюється, як змінюються й активність метаболічних шляхів генерації макроерга. Це зумовлено умовами культивування: компонентним складом середовищ, субстратами окиснення і біологічно активними сполуками (гормонами, антиоксидантами, вітамінами), pH [10–13].

У зв'язку з вказаним, метою досліджень було вивчити особливості дихальної активності та відновної здатності клітин гранульози при культивуванні.

Матеріали і методи. Після забою корів брали яєчники різного фізіологічного стану [14]. Антральну рідину отримували шляхом аспірації фолікулів, центрифугували при 2000 об./хв, супернатант відділяли, а осад клітин суспендували в середовищі Basal Medium Eagle (BME; Sigma), кількість якого відповідала об'єму фолікулярної рідини. Отриману суспензію клітин гранульози вносили у планшети (діаметр лунок 3 см) і культивували у BME протягом шести діб у герметично закритому ексикаторі при 100 % вологості і за температури 38,5 °С. Через кожні 48 год вивчали інтенсивність поглинання кисню — полярографічно (нг-атом О/0,1 мл суспензії клітин (СК)/ хв), відновну здатність — потенціометрично (мВ/0,1 мл СК/ хв) [15]. У якості позаклітинного акцептора електронів використовували ферриціанід калію (10^{-4}М). Для встановлення залежності між інтенсивністю поглинання кисню, позаклітинним транспортом електронів та часткою шляхів метаболізму в реалізації субстратів окиснення використовували інгібітори: гліколізу — натрій фторид (NaF; 10^{-3}М), НАДН-залежної ділянки дихального ланцюга — амітал (АМ; $5*10^{-3}$М), термінальної — натрій азид (NaN_3; $5*10^{-2}$М), вільнорадикальне окиснення жирних кислот гальмували NaЕДТА — 6×10^{-4}М [16]. Аналіз результатів досліджень проведено за М. О. Плохінським [17].

Результати та обговорення. Дихальна активність клітин гранульози у BME після

вилучення з фолікулів становить 5,3±0,60 нг-атом О/0,1мл СК/ хв, відновна здатність — 3,0±1,06 мВ/0,1мл СК/хв. При цьому, виявлені особливості використання кисню та транспорту електронів у позаклітинне середовище окремими ланками ланцюга ресинтезу АТФ гранульози у процесі культивування. Так, свіжоотримані клітини, при додаванні акцептора електронів у позаклітинне середовище, знижують дихальну активність на 47,2 % і відновну здатність — у 2,5 раза (рис. 1). Виявлені зміни величин досліджуваних показників вказують на високу лабільність обмінних процесів, що забезпечує клітинам можливість пристосовуватись до умов культивування та взаємодіяти з іншими структурними компонентами фолікулів яєчників (клітинами теки й ооцитом).

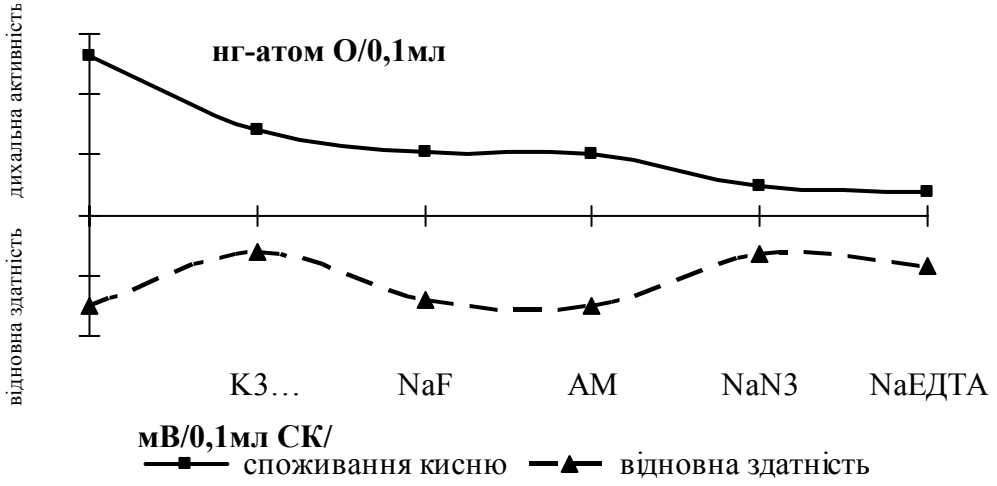

Рис. 1. Дихальна активність й відновна здатність свіжоотриманих клітин гранульози

У присутності позаклітинного акцептора електронів, інгібітор гліколізу зменшує споживання кисню на 25 %, а відновна здатність, навпаки, зростає у 2,3 раза. Отже, за рахунок аеробного гліколізу клітинами використовується близько 25 % кисню. При цьому, основним джерелом електронів, що постачаються в позаклітинний простір, є гліколіз.

Гальмування транспорту електронів у НАД-залежній ділянці ланцюга дихання не змінює інтенсивності використання кисню (2,1±0,18 нг-атом О/0,1мл СК/хв) і відновної здатності (3,0±0,85 мВ/0,1мл СК/хв) клітин. Встановлена особливість, можливо, зумовлена дефіцитом кисню у середовищі культивування і активуванням сукцинатоксидазного шляху окиснення [18].

Блокування транспорту електронів у термінальній ланці дихального ланцюга (цитохромоксидази) знижує дихальну активність на 90,9 % і відновну здатність — у 2,3 раза. Отже, основна частка кисню реалізується клітинами у ланцюзі дихання мітохондрій для ресинтезу АТФ. Встановлене зниження відновної здатності гранульози при гальмуванні активності цитохромоксидази підтверджує висновок про спрямованість потоку електронів у ланцюзі дихання мітохондрій до його термінальної ланки.

Приблизно 19 % кисню, від загальної кількості спожитого клітинами, реалізується у немітохондрійних окисних процесах (ціанідрезистентним шляхом). При цьому, гальмування вільнорадикального окиснення ненасичених кислот зменшує використання кисню на 0,3 нг-атом О/0,1мл СК/хв (27,3 % від спожитого при немітохондрійному окисненні), а відновна здатність збільшується на 0,4 мВ/0,1мл СК/хв (30,7 %).

Вивченням вказаних біохімічних показників у культурі клітин через 48 год виявлено нижчу в 3,5 раза дихальну активність, а відновна здатність майже не змінюється (2,4±0,57 мВ/0,1мл СК/хв), порівняно з величинами свіжоотриманих клітин (рис. 2). Понижена інтенсивність використання кисню при високому транспорті електронів у позаклітинне середовище може вказувати на дефіцит акцептора в середовищі культивування клітин гранульози і активування гліколізу.

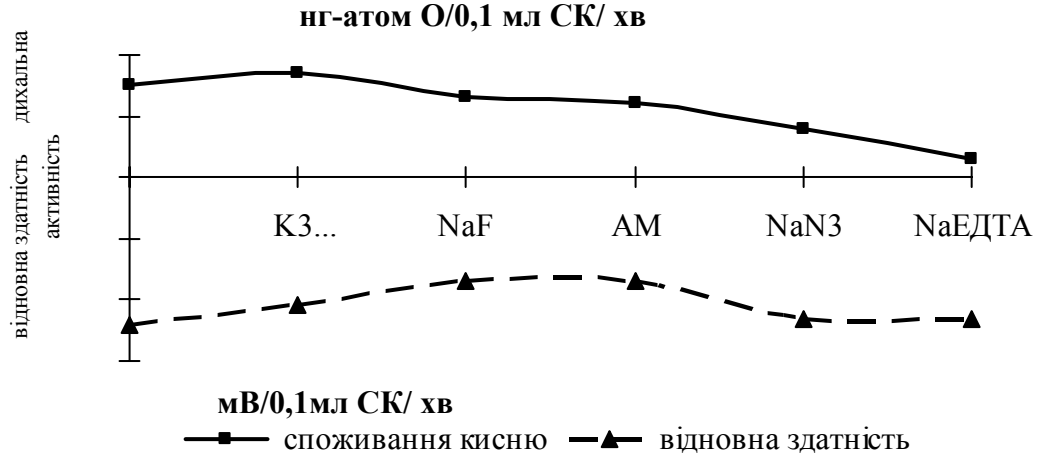

Рис. 2. Дихальна активність й відновна здатність клітин гранульози, інкубованих 48 год

Додавання ферриціаніду калію підвищує на 33,3 % дихальну активність інкубованих клітин, а відновна здатність залишається без змін (2,1±0,50 мВ/0,1мл СК/хв). Отже, балансування окисно-відновного потенціалу середовища стимулює транспорт електронів у дихальному ланцюзі органел клітин гранульози.

Використання інгібітора гліколізу виявило особливості окисно-відновних процесів в інкубованих 48 год клітинах. Зокрема, гальмується споживання кисню на 35 % і знижується потік електронів у позаклітинний простір на 19,1 %. Отже, в інкубованих клітин гранульози зростає активність аеробного гліколізу, що зумовлює зменшення потоку електронів у позаклітинне середовище.

Обмеження транспорту електронів у НАД-залежній ділянці дихального ланцюга не змінює величин досліджуваних показників (дихальна активність — 1,3±0,15 нг-атом О/0,1 мл СК/хв, відновна здатність — 1,7±0,48 мВ/0,1мл СК/хв). Тобто, у клітин гранульози, які культивували 48 год, аналогічно свіжоотриманим, НАД-залежна ланка ланцюга дихання не активна.

Інгібітор цитохромоксидази знижує споживання кисню на 38,5 %, а відновну здатність, навпаки, збільшує на 13,5 %. Таким чином використання кисню за рахунок термінальної ланки дихального ланцюга клітин гранульози понижене, порівняно зі свіжоотриманими клітинами. При цьому, обмеження транспорту електронів до кисню виявляє альтернативний (ціанідрезистентний) шлях — на позаклітинні акцептори.

При вивченні немітохондрійного дихання виявлено, що на вказаний процес припадає близько 53 % від загальної кількості спожитого кисню. Із частки кисню, що реалізується ціанідрезистентним шляхом, на вільнорадикальне окиснення ненасичених жирних кислот припадає 62,5 %. При цьому, відновна здатність клітин не змінюється і становить 2,3±0,54 мВ/0,1мл СК/хв.

Збільшення тривалості культивування до 96 год стимулює дихальну активність й відновну здатність клітин, порівняно з 48-годинним культивуванням. Споживання кисню зростає у 2,7 раза, а відновна здатність — на 25 % (рис. 3). Додавання акцептора електронів зумовлює тенденцію до зниження дихальної активності і відновної здатності клітин, які становлять, відповідно, 4,0±0,37 нг-атом О/0,1 мл СК/хв і 3,0±0,50 мВ/0,1мл СК/хв. Отже, клітини гранульози через 96 год культивування, порівняно зі свіжоотриманими клітинами, проявляють подібну залежність інтенсивності окисних процесів від акцептора електронів у середовищі визначення.

Інгібітор гліколізу зменшує дихальну активність на 25 %, а відновна здатність підвищується на 26,6 %. Тобто при інкубуванні 96 год використання кисню аеробним гліколізом становить ¼ від загальної кількості спожитого гранульозою. При цьому, виявлена адекватна реакція клітин на інгібітор гліколізу — відновна здатність клітин зростає майже на таку ж величину (26,6 %), на яку знизилось споживання кисню (25 %).

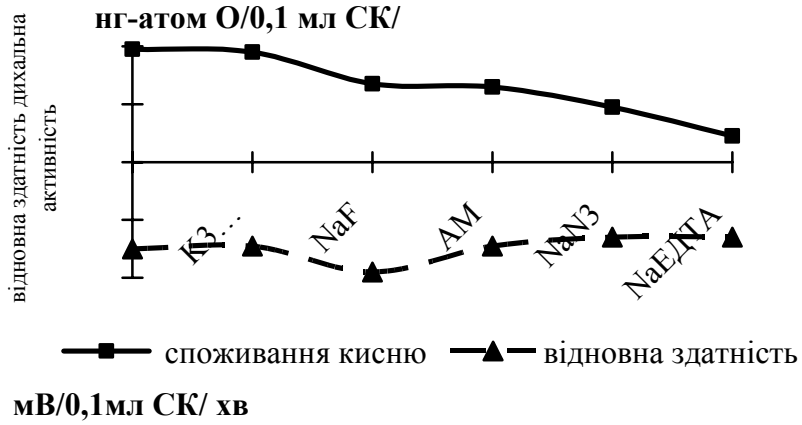

Рис. 3. Дихальна активність й відновна здатність клітин гранульози, інкубованих 96 год

Амітал майже не змінює споживання кисню, яке становить 2,6±0,30 нг-атом О/0,1 мл СК/хв та знижує відновну здатність на 21,1 %. Отже, через 96 год інкубування проявляється активність НАД-залежної ланки ланцюга дихання у клітин гранульози. При цьому, потік електронів з вказаної ланки ланцюга дихання спрямований на позаклітинні акцептори.

Інгібітор цитохромоксидази знижує дихальну активність на 33,4 % і відновну здатність — на 13,4 %.

При вивченні ціанідрезистентного дихання виявлено, що його величина становить приблизно 23 % від загальної кількості спожитого кисню клітинами. Отже, інтенсивність немітохондрійних окисних процесів у клітинах при 96-годинному культивуванні знижується, порівняно з 48-годинним. При цьому, знижується і частка кисню, що використовується при вільнорадикальному окисненні ненасичених жирних кислот (50 % від величини немітохондрійного окиснення). Відновна здатність клітин гранульози при використанні NaЕДТА не змінюється, порівняно з величиною за дії натрію азиду, і становить 2,6±0,85 мВ/0,1 мл СК/хв.

Збільшення тривалості культивування до 144 год характеризується тенденцією до підвищення (на 12,5 %) дихальної активності клітин гранульози, а відновна здатність не змінюється (3,0±0,41 мВ/0,1 мл СК/хв), порівняно зі значеннями при 96-годинному культивуванні (рис. 4).

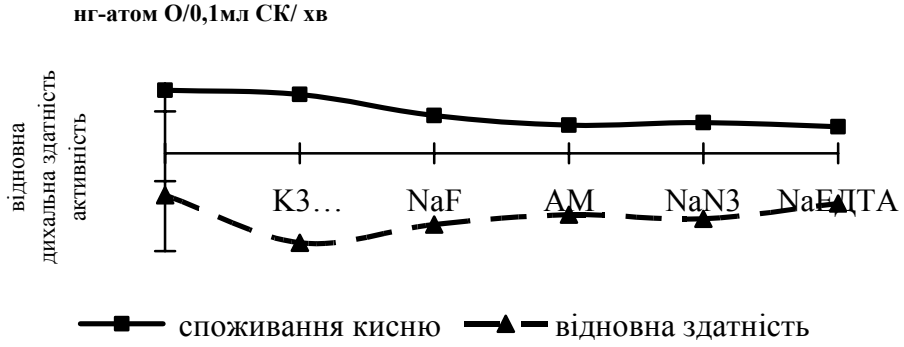

Рис. 4. Дихальна активність й відновна здатність клітин гранульози інкубованих 144 год

Додавання акцептора електронів знижує дихальну активність клітин (на 6,7 %), а відновна здатність зростає у 2,1 раза. Отже, тривале культивування клітин гранульози супроводжується нагромадженням у середовищі відновних еквівалентів і, відповідно, втратою можливостей клітин їх утилізувати.

Інгібітор гліколізу знижує дихальну активність клітин на 35,8 % та відновну здатність на 20,4 %. Тобто гранульоза через 144 год адаптувалася до умов культивування, що підтверджується зростанням частки аеробного гліколізу у використанні субстратів

середовища, порівняно з клітинами при 96-годинному інкубуванні.

У вказаний період у клітинах гранульози активується НАД-залежна ланка ланцюга дихання, за рахунок якої утилізується 30 % кисню та транспортується 45,4 % електронів у позаклітинний простір.

Проте у клітин не проявляється активність термінальної ланки ланцюга дихання. Інгібітор цитохромоксидази не змінює дихальну активність і відновну здатність гранульози, порівняно з величинами значень НАД-залежної ланки ланцюга дихання, які становлять відповідно 2,3±0,27 нг-атом О/0,1мл СК/хв та 4,7±0,74 мВ/0,1мл СК/хв.

При вивченні немітохондрійного окиснення виявлено, що величина ціанідрезистентного дихання становить приблизно 49 % від загальної кількості спожитого кисню клітинами. При цьому, кількість кисню, що використовується у процесах вільнорадикального окиснення ненасичених жирних кислот, займає 13,1 % від спожитого в немітохондрійних процесах, а транспорт електронів у позаклітинне середовище — 23,5 %.

В И С Н О В К И

1. Інтенсивність споживання оксигену та відновна здатність клітин гранульози залежать від тривалості культивування: через 48 год інкубування зростають величини значень досліджуваних показників.
2. Позаклітинний акцептор електронів нормалізує інтенсивність окисних процесів клітин при культивуванні.
3. Активність анаеробного і аеробного гліколізу залежить від часу культивування клітин гранульози: при збільшенні часу інкубування зростає активність аеробного гліколізу.
4. НАД-залежна ділянка ланцюга дихання клітин гранульози проявляє активність через 96 год культивування.
5. Збільшення тривалості культивування характеризується гальмуванням використання оксигену термінальною ланкою дихального ланцюга (цитохромоксидазою).
6. Інтенсивність немітохондрійних окисних процесів у клітинах зростає зі збільшенням часу культивування.
7. Частка оксигену, яка використовується у вільнорадикальному окисненні ненасичених жирних кислот, після 48 год культивування знижується.

Перспективи подальших досліджень. Доцільно було б дослідити інтенсивність споживання оксигену та відновну здатність клітин гранульози у залежності від різної тривалості культивування та впливу екзогенних чинників.

THE FEATURES OF OXIDATIVE PROCESSES IN CULTIVATION OF GRANULOSE CELLS

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

S U M M A R Y

The features of oxidative processes in granulose cells of ovarian follicles of cows in connection of cultivating time were studied. It was established, that the intensity of oxygen consumption and the recovery capability of granulose cells increases after 48 hours of incubation. Thus, the activity of aerobic glycols and the intensity of nonmitochondrial oxidative processes increases, with the lowering of quantity of oxygen that is used in free radical oxidation of unsaturated fatty acids. Extracellular acceptor of electrons normalizes the intensity of oxidative processes of cultivating. Activity of NAD-dependent link of respiratory chain of granulose cells appears after 96 hours of cultivating, and activity of cytochrome oxidase is inhibited.

ОСОБЕННОСТИ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В КЛЕТКАХ ГРАНУЛЁЗЫ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ

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

А Н Н О Т А Ц И Я

Изучали особенности окислительных процессов клеток гранулёзы фолликулов яичников коров в связи с длительностью культивирования. Установлено, что интенсивность поглощения Кислорода и восстановительная способность клеток гранулёзы возрастают через 48 часов инкубирования. При этом, повышаются активность аэробного гликолиза и интенсивность немитохондриальных окислительных процессов со снижением доли Кислорода, которая используется в свободнорадикальном окислении ненасыщеных жирных кислот. Внешнеклеточный акцептор электронов нормализирует интенсивность окислительных процессов во время культивирования. Активность НАД-зависимого звена цепи дыхания клеток гранулёзы проявляется через 96 часов культивирования, а цитохромоксидазы — ингибируется.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. *Gutierrez C. G.* Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture in vitro / C. G. Gutierrez, J. H. Ralph, E. E. Telfer et al. // Biol. Reprod. — 2000. — V. 62. — P. 1322–1328.

2. *Huamin Z.* In vitro development of caprine ovarian preantral follicles / Z. Huamin, Z. Yong // Theriogenology. — 2000. — V. 54. — P. 641–650.

3. *Silva C. M. G.* In vitro survival and development of goat preantral follicles in two different oxygen tensions / C. M. G. Silva, M. H. T. Matos, G. Q. Rodrigues et al. // Animal Reproduction Science. — 2010. — V. 117. — P. 83–89.

4. *Clark A. R.* Mathematical modelling of oxygen concentration in bovine and murine cumulus-oocyte complexes / A. R. Clark, Y. M. Stokes, M. Lane, J. G. Thompson // Reproduction. — 2006. — V. 131. — P. 999–1006.

5. *Redding G. P.* Mathematical modelling of oxygen transport-limited follicle growth / G. P. Redding, J. E. Bronlund, A. L. Hart // Reprod. Res. — 2007. — V. 133. — P. 1741–1899

6. *Houghtona F. D.* Functional Significance of Gap Junctional Coupling in Preimplantation Development / F. D. Houghtona, K. J. Barra, G. Walterd et al. // Biol. Reprod. — 2002. — V. 66. — P. 1403–1412.

7. *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 / S. Hashimoto, N. Minami, M. Yamada // Mol. Reprod. Dev. — 2000. — V. 56. — P. 520–526.

8. *Harris G. F.* Granulosa cells regulate intracellular pH of the murine growing oocyte via gap junctions: development of independent homeostasis during oocyte growth / G. F. Harris, J. M. Baltz // Development. — 2006. — V. 133. — P. 591–599.

9. *Roberts R.* Energy substrate metabolism of mouse cumulus-oocyte complexes: response to follicle-stimulating hormone is mediated by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway and is associated with oocyte maturation / R. Roberts, J. Stark, A. Iatropoulou et al. // Biol. Reprod. — 2004. — V. 71. — P. 199–209.

10. *Rroberts A.* In Vitro Production of Estradiol by Bovine Granulosa Cells: Evaluation of Culture Condition, Stage of Follicular Development, and Location of Cells Within Follicles / A. Rroberts, S. E. Echternkamp // Biol. Reprod. — 1994. — V. 51. — P. 273–282.

11. *Takehiro Itoh.* Growth, Antrum Formation, and Estradiol Production of Bovine

Preantral Follicles Cultured in a Serum-Free Medium / Takehiro Itoh, Masayuki Kacchi, Hiroyuki Abe, Yutaka Sendai, Hiroyoshi Hoshi // Biol. Reprod. — 2002. — V 67. — P. 1099–1105.

12. *Sutton-McDowall M. L.* Cumulus expansion and glucose utilisation by bovine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation: the influence of glucosamine and follicle-stimulating hormone / M. L. Sutton-McDowall, R. B. Gilchrist, J. G. Thompson // Reproduction. — 2004. — V. 128(3). — P. 313–319**.**

13. *Harris F. G.* Granulosa cells regulate oocyte intracellular pH against acidosis in preantral follicles by multiple mechanisms / F. G. Harris, V. Siyanov, J. M. Baltz // Development. — 2007. — V. 134. — P. 4283–4295.

14. *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.

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

16. Методы измерения дыхательной активности микросом / Современные методы в биохимии / под ред. В. Н. Ореховича. — М. : Медицина, 1977. — С. 59–60.

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

18. *Маевский Е. И.* Сукцинат — продукт анаэробных превращений и гипоксический субстрат / Е. И. Маевский, Е. В. Гришина, А. С. Розенфельд и др. — В кн. : Гипоксия, механизмы, адаптация, коррекция : Труды Второй Всерос. конф. — М., 1999. — С. 43–44.

Рецензент: старший науковий співробітник лабораторії ембріональної біотехнології, кандидат ветеринарних наук Сливчук Ю. І.