

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН НААН

На правах рукопису

БОДНАР ЮЛІЯ ВОЛОДИМИРІВНА

УДК 636.03:577.1

АКТИВНІСТЬ ОКИСНИХ ПРОЦЕСІВ ТА УТВОРЕННЯ ГОРМОНІВ
КЛІТИНАМИ ГРАНУЛЬОЗИ ЯЄЧНИКІВ КОРІВ

03.00.04 – біохімія

Дисертація на здобуття наукового ступеня
кандидата сільськогосподарських наук

Науковий керівник
ОСТАПІВ ДМИТРО ДМИТРОВИЧ
доктор сільськогосподарських наук

ЛЬВІВ 2016

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ	4
ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	10
1.1. Дихальна активність і ензими енергетичного обміну клітин гарнульозного шару фолікулів.	10
1.2. Активні форми Оксигену і ензиматична система антиоксидантного захисту клітин	17
1.3. Регулювання та синтез стероїдних гормонів клітинами гранульози	22
1.4. Вибір напрямку досліджень	31
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	33
2.1. Відбір матеріалу та схема проведення досліджень	33
2.2. Дослідження біохімічних показників	34
2.2.1. Визначення дихальної активності та відновної здатності клітин гранульози	34
2.2.2. Визначення вмісту загального протеїну та його спектру в культурі клітин гранульози	35
2.2.3. Визначення активності та вмісту ізозимів лактат- і малатдегідрогеназ, ензимів антиоксидантного захисту	36
2.2.4. Визначення концентрації статевих гормонів у культурі клітин гранульози.	41
2.2.5. Дослідження впливу окремих факторів на інтенсивність окисних процесів і синтез гормонів клітинами гранульози	41
2.2.6. Апробування ефективності ветеринарного препарату на основі середовища культивування клітин гранульози.	43
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ	44
3.1. Дихальна активність та відновна здатність клітин гранульози	44
3.2. Активність і вміст ізозимів лактатдегідрогенази та малатдегідрогенази клітин гранульозного шару фолікулів корів	48

	3
3.3. Активність і вміст ізозимів ензимів антиоксидантного захисту за культивування клітин гранульози	57
3.4. Спектр протеїнів культури клітин гранульози з фолікулів яєчників корів	69
3.5. Концентрація гормонів в культурі клітин гранульози	83
3.6. Кореляції між інтенсивністю окисних процесів, вмістом протеїнів та утворенням гормонів клітинами гранульози фолікулів яєчників корів	86
3.7. Вплив окремих факторів на інтенсивність окисних процесів і синтез гормонів клітинами гранульози	117
3.8. Апробування ефективності ветеринарного препарату на основі середовища культивування клітин гранульози. Економічна ефективність використання препарату «Фоліген»	128
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ	131
ВИСНОВКИ	148
ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ	150
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	151
ДОДАТКИ	192

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

A4 – андростенодіон

BMP – морфогенетичні протеїни кістки

ГПО – глутатіонпероксидаза

GSH – відновлена і GSSG - окиснена форми глутатіону

DHEA – дегідроепіандростерон

DHT – дегідротестостерон

E – естрадіол

EGF – епідермальний фактор росту

eNOS – синтаза оксиду азоту ендотелію

IGF – інсуліноподібний фактор росту

KAT – каталаза; KAT1; KAT2 – ізоформи ензиму

ЛДГ – лактатдегідрогеназа

ЛПНЩ – ліпопротеїни низької і ЛПДНЩ – дуже низької щільності

ЛН – лютеїнізуючий гормон

ММ – молекулярна маса

МДГ – малатдегідрогеназа; МДГ1 – цитозольна; МДГ5 – мітохондріальна

ПААГ – поліакриламідний гель

Nodal – фактор росту 7,5 добового ембріону миші

P – прогестерон

СОД – супероксиддисмутаза: MnСОД (S4) – мітохондріальна; Cu,ZnСОД (S0, S1, S2, S3)– цитоплазматична; ЕЦ-СОД (S5) – позаклітинна (екзоцелюлярна)

StAR – стероїдогенний регуляторний білок

T – тестостерон

TGF – трансформуючий фактор росту

TNF α – фактор некрозу пухлини

GDF9 – фактор диференціювання і росту 9

hCG – хоріогонічний гонадотропін

FSH – фолікулостимулюючий гормон

FSHR – рецептор фолікулостимулюючого гормону

ВСТУП

Актуальність теми. Клітини гранульозного шару розміщені на внутрішній поверхні фолікула та оточують ооцит, формуючи навколо нього яйценосний горбик [1]. Їх метаболізм визначається роллю у дозріванні яйцеклітини, а взаємний вплив кумулюсного оточення й ооцита характеризують високу ймовірність повноцінного дозрівання і запліднення статевої клітини [2, 3, 4, 5]. Серед фізіологічних особливостей клітин гранульози є здатність утворювати стероїдні гормони: тестостерон, естрадіол і прогестерон [6, 7, 8]. Інтенсивність стероїдогенезу клітин - величина не постійна й залежить від багатьох чинників: інтенсивності кровообігу, постачання кисню до яєчника та фолікулів, концентрації гонадотропних гормонів, ступеня зрілості цитоплазми і ядра ооцита, наявності субстратів окиснення тощо [9, 10, 11]. Функції клітин гранульози забезпечують численні біохімічні процеси, серед яких важливе місце посідають окиснювально-відновні та білоксинтезувальні [12, 13, 14]. З'ясовано, що за культивування фолікулів концентрація стероїдних гормонів залежить від вмісту кисню в середовищі [15]. Ця залежність зумовлена здатністю клітин гранульози використовувати субстрати у процесах окисного метаболізму, нагромаджувати й утилізувати цитотоксичні продукти Оксигену. При цьому від інтенсивності нагромадження активних форм Оксигену (АФО) і швидкості їх перетворення залежить існування гранульози, утворення стероїдних гормонів та біологічно активних речовин як *in vivo*, так й *in vitro* [16]. 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 0111U006151, 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 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 гранульозою статевих гормонів. Визначено вміст протеїнів (розчинних і структурних) у культурі клітин та виявлено кореляції величин їх значень зі здатністю утворювати стероїдні гормони гранульозою. 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 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-ізоциму 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. Автором 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

Vuiatrics (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.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Дихальна активність і ензими енергетичного обміну клітин гранульозного шару фолікулів

Клітини гранульозного шару (гранульоза) – це компоненти фолікулів яєчників самок, які локалізовані на внутрішній оболонці фолікула (*teka interna*). Тека інтерна складається з пухкої тканини і пронизана кровоносними судинами [17, 18]. Гранульоза розміщена на базальній мембрані і вистеляє внутрішню порожнину фолікула нерівномірно. Ці клітини нагромаджуються в одному місці фолікула, де утворюється яйценосний горбик, в якому розвивається ооцит. На ранніх стадіях розвитку фолікулів гранульоза щільним шаром оточує ооцит, формуючи «колиску», в якій росте статеві клітина, а на більш пізніх - зростають відстані і втрачаються міжклітинні зв'язки. Причиною вказаних змін клітин кумулюсу є продукція гіалуронової кислоти [19, 20].

Між яйценосним горбиком і ооцитом існує тісний взаємозв'язок. Завдяки трансзональним цитоплазматичним відросткам клітин гранульози і міжклітинним каналам забезпечується передача низькомолекулярних сполук між ооцитом і клітинами гранульози, а також між самими клітинами гранульози [21, 22]. Крім того, ооцит впливає на функціональну активність гранульози. Виявлено, що паракринні сигнали ооцита регулюють метаболізм клітин гранульози і функцію яєчника [23]. Ооцити синтезують фактори росту (GDF-9; GDF-9B; BMP-15), які необхідні для ранніх [24] та пізніх стадій розвитку фолікулів [25, 26, 27]. Після овуляції на місці розірваних фолікулів утворюється за рахунок клітин гранульози і внутрішньої теки жовте тіло.

Клітини гранульози, в тому числі й кумулюсу, залежно від стадій розвитку фолікулів (ооцитів) характеризуються неоднаковою ультраструктурною морфологією і умовно розділені на три типи. Зокрема, при відборі клітин гранульози з яєчників, залежно від стадій статевого циклу і

фізіологічного стану (метеструс - на місці овульованого фолікула є відтулина, присутнє жовте тіло червоного кольору, дієструс - на місці овульованого фолікула утворилось жовте тіло червоно-коричневого забарвлення з наявними на поверхні судинами, і проєструс - в жовтому тілі відсутні судини і виявляється великий фолікул більше 10 мм) [28] найчастіше отримували гранульозу фолікулярного типу (третього) [29].

Для першого типу - характерні недиференційовані кумулюсні клітини, які з'єднані між собою міжклітинними зв'язками з низьким співвідношенням ядра з цитоплазмою, в центрі ядро з помітними ядерцями, цитоплазма містить подовжені мітохондрії, дифузний комплекс Гольджі, жорсткою ендоплазматичною сіткою, поодинокими включеннями ліпідів та глікогену, щільними бульбашками і малими мікроворсинками [30, 31]. Цей тип клітин утворює моношар в культурі та експресує молекули клітинної адгезії NCAM (бере участь у формуванні порожнини фолікула) і N-кадгерін, проявляє не постійну експресію ліпопротеїнових рецепторів [32].

Другий тип клітин подібний до гранульози після стимулювання LH: клітини подовженої форми, з формованими клітинними виступами і розширеними міжклітинними проміжками, в цитоплазмі присутні округлі мітохондрії, великі ліпідні краплі, добре розвинений апарат Гольджі, цистерни жорсткої ендоплазматичної сітки і збільшені бульбашки гладкої ендоплазматичної сітки. У цих клітинах мікротрубочки оточують апарат Гольджі і контролюють транспорт холестерину, мікрофіламентів і секрецію компонентів позаклітинного матриксу [31]. Другий тип клітин синтезує цАМФ і нагромаджує глікоген, а в ліпідних крапельках - холестерин, шляхом рецептор-опосередкованого поглинання ліпопротеїнів, виробляє прогестерон та інші стероїди у відповідь на дію FSH і LH. Крім того, клітини гранульози здатні синтезувати базальну пластину, а також гормональні пептиди і фактори росту, які регулюють їх ріст та диференціювання [33]. Значне нагромадження глікогену і транспорт його у вакуолі, ймовірно, зумовлений потребою клітин в глюкозі для глікозилування синтезованих протеїнів [34].

Для третього типу клітин характерна присутність мітохондрій, перехід глікопротеїнів та хондроїтинсульфату з бульбашок апарату Гольджі і цистерн ендоплазматичного ретикулума в дуже великі вакуолі та екзоцитоз їх вмісту в позаклітинний простір. У клітин гранульози цього типу виявляються малі краплі ліпідів, зменшення кількості глікогену, що може вказувати на зниження активності клітин і виснаження внутрішніх депо енергії. Крім цього, зростають проміжки між клітинами [35].

Ультраструктурна морфологія клітин вказаних типів узгоджується з інтенсивністю стероїдогенезу. За стимулювання FSH, клітини гранульози продукують естрадіол, який своєю чергою експресує рецептори LH, бере участь в формуванні антруму, розвитку внутрішньоклітинних зв'язків і профілактиці атрезії [36]. Клітини гранульози першого і другого типу проявляють властивості активних секреторних клітин, у той час, як третього типу характеризуються великою вакуолею, яка вступає в екзоцитоз.

Дослідженням ультраструктурної морфології клітин встановлено, що гранульоза має всі структурні компоненти, які притаманні клітинам ссавців, засвоює поживні речовини *in vitro* та *in vivo*, проявляє дихальну активність, ресинтезує АТФ і продукує статеві (стероїдні) гормони [37].

Клітини гранульозного шару фолікулів яєчників корів для існування отримують енергію гліколізом і диханням [12]. При цьому, гранульоза використовує глюкозу й засвоює амінокислоти, проявляє характерні, залежні від субстратів окиснення, дихальну активність і відновну здатність [38, 39, 40, 41]. Дихання — процес використання кисню клітинами для окиснення органічних субстратів з утворенням вуглекислого газу та води. Субстратами першого етапу дихання є органічні речовини: амінокислоти, білки, вуглеводи, жири. Субстратами ж окиснення в дихальному ланцюгу є карбонові кислоти, перетворення яких відбувається в циклі Кребса. Саме цикл трикарбонових кислот (ЦТК) постачає уніфіковані субстрати для подальшого їх окиснення дегідрогеназами карбонових кислот, які локалізовані в мітохондріях клітин. До складу молекули ензимів входять переносники водню (НАД і ФАД), які,

відновлюючись, передають електрони до цитохромів. Цитохроми, своєю чергою, переносять електрони до кисню з утворенням води. Енергія, що вивільняється в процесі перенесення водню й електронів, акумулюється в АДФ та АТФ. Крім того, дихання контролює інтенсивність гліколізу (ефект Пастера).

Встановлено, що відмінності у шляхах використання субстратів клітинами, в тому числі й гранульози, для ресинтезу АТФ зумовлені різними фізіологічними станами статевої залози та розмірами фолікулів, з яких вони отримані, інтенсивністю кровообігу і постачанням кисню до яєчника [42, 43], умовами культивування: компонентним складом, субстратами окиснення і біологічно активними сполуками (гормонами, антиоксидантами, вітамінами) [44, 45], рН середовищ [46, 47], присутністю в культурі ооцита [12].

Виявлено, що клітини гранульози чутливі до інгібіторів: гліколізу, НАД – залежної та термінальної (цитохромоксидази) ланок дихального ланцюга, вільнорадикального окиснення жирних кислот (Na_2EDTA) [48]. Зокрема, встановлено, що в клітинах гранульози від 9,9 % (середнього фолікула яєчника “фолікулярного зростання”) до 42,3 % (малого фолікула яєчника “свіжої овуляції”) величини спожитого кисню реалізується за рахунок аеробного окиснення цукрів (гліколізу), який постачає субстрати (піруват) в дихальний ланцюг та анаеробного – забезпечує надходження в порожнину фолікула відновних еквівалентів. Величина кисню, яка реалізується за рахунок НАД-залежної ланки дихального ланцюга становить від 13,3 % (малих фолікулів яєчника “раннього” жовтого тіла) до 49,2 % (середнього фолікула яєчника “фолікулярного зростання”), а на ціанідрезистентний шлях дихання припадає від 26,9 % (середній фолікул “раннього” жовтого тіла) до 55,5 % (великий фолікул “раннього” жовтого тіла) загальної кількості спожитого кисню. Результати досліджень узгоджуються з висновками про те, що клітини гранульози відіграють центральну роль в утилізації глюкози і перетворюють її в піруват, який використовується ооцитом для виживання і мейотичного дозрівання за культивування *in vitro*. Клітини кумулюсу відразу перетворюють глюкозу на піруват для забезпечення ооцитів джерелом енергії [49, 50, 51].

Підтверджується здатність синтезувати піруват гранульозною дослідженнями клітин кумулюсу миші і ооцит-кумулясних комплексів [52, 53]. Також виявлено, що в процесі дозрівання ооцит-кумулясних комплексів корів зростає використання пірувату, а продукція 14CO_2 від $[1-14\text{C}]$ глюкози в цей час – низька і відносно постійна [54]. Тобто, клітини кумулюсу перетворюють глюкозу до пірувату або проміжних ланок ЦТК, які можуть передаватися ооцитові та покращувати дозрівання [55].

Серед ензимів, які здатні характеризувати інтенсивність використання глюкози і постачання субстратів в ЦТК є лактатдегідрогеназа (ЛДГ) і малатдегідрогеназа (МДГ).

Лактатдегідрогеназа (ЛДГ; L-лактат: NAD-оксидоредуктаза, К.Ф. 1.1.1.27) - цинквмісний ензим, який характеризує метаболічну і енергогенеруючу здатність клітин гранульози. ЛДГ є кінцевою ланкою окиснення глюкози анаеробним шляхом і першою - у перетворенні лактату в піруват, який, своєю чергою, використовується в ЦТК. Ензим каталізує зворотну реакцію окислення L-лактату до пірувату (і навпаки) з використанням NAD^+ (НАДН). Лактатдегідрогеназа - тетрамерна молекула, яка складається з поліпептидних субодиниць, кодованих двома структурно різними генами ЛДГА і ЛДГВ [56]. Вираз генів ссавців для ЛДГА і ЛДГВ регулюється з розвитком і є тканино-специфічним [57].

Лактатдегідрогеназа є внутрішньоклітинним ензимом, який виявлений в різних тканинах, таких як скелетні м'язи, серце, печінка і нирки. Ензим в тканинах проявляється 5 ізозимами. У м'язовій тканині переважає 4 ідентичних М-ланцюги (А – м'язова ЛДГ), а у тканині серця — 4 ідентичні Н-ланцюги (В – серцева ЛДГ). Поєднання цих субодиниць є випадковим і призводить до утворення п'яти різних «ізозимів» ЛДГ (ЛДГ1, ЛДГ2, ЛДГ3, ЛДГ4 і ЛДГ5), які розділяються методом електрофорезу в поліакриламідному гелі на п'ять окремих смуг [58, 59], де ЛДГ1 має найвищу, а ЛДГ5 низьку електрофоретичну швидкість міграції до анода.

Утворення лактату залежить від вмісту кисню в середовищі. Зокрема, за

інкубування тканин при пониженому вмісті кисню в середовищі зростає продукція лактату з 3 до 8 %. Однак, за дуже високих концентрацій кисню (> 20 %) спостерігається подібна залежність: у тканині серця збільшується утворення лактату незважаючи на низьку М-ЛДГ [60]. Ймовірно, рівень кисню за природних умов впливає на розподіл субодиниць ЛДГ і, таким чином, призводить до зміни швидкості перетворення пірувату в молочну кислоту [61]. Вивченням вмісту ізоформ ЛДГ за різних концентрацій кисню у середовищі, відношень між окремими ізозимами, визначено спрямованість реакцій перетворення й утворення лактату чи пірувату - анаеробний чи аеробний шляхи окиснення цукрів [56].

Спрямованість реакцій перетворення гексоз у субстрат ЦТК залежить від багатьох факторів. Так, вказані зміни опосередковано можуть бути зумовлені впливом гормонів, зокрема, гонадотропних. Встановлено, що вміст лактату постійно зростає *in vitro* у преантральних фолікулах миші за розвитку їх до антральної стадії, а FSH окремо чи в комбінації з LH стимулює вказаний процес. Це твердження узгоджується з результатами досліджень про залежність стероїдогенезу клітин гранульози від кисневої напруженості *in vivo*, який своєю чергою зумовлений інтенсивністю кровообігу і постачанням кисню до яєчника [62]. Крім того, існує позитивна кореляція між утилізацією глюкози і продукцією лактату, оскільки підвищення споживання енергії ростучим фолікулом, із зменшенням поступлення O_2 , призводить до інтенсивного гліколізу і збільшення його кінцевого продукту [63, 64]. Ці результати підтверджуються зменшенням у два рази в фолікулярній рідині O_2 (59,8 ммНг в фолікулярній рідині проти 102 ммНг в материнській крові) і вищим вмістом CO_2 (46,9 ммНг в фолікулярній рідині проти 38,3 ммНг в крові), нижчим рН, порівняно з кров'ю (7,33 і 7,41 відповідно) [65].

Малатдегідрогеназа (КФ 1.1.1.37, L-малат: НАД оксидоредуктаза; МДГ) – ензим, що каталізує зворотне перетворення малату в оксалоацетат використовуючи $НАД^+$ як акцептор електронів [66]. У клітинах ссавців МДГ існує в двох формах – цитоплазматичній (цМДГ; МДГ1) і мітохондріальній

(мМДГ; МДГ2). Перша знаходиться в цитоплазмі і є компонентом малат-аспартатного шунту, що здійснює перенесення відновних еквівалентів з цитозоллю в матрикс мітохондрій. Друга знайдена в матриксі мітохондрій і, як ключовий ензим в циклі Кребса – каталізує окиснення малату. Поділ ензиму на дві основні філогенетичні групи - цМДГ і мМДГ визначається послідовністю амінокислот [67]. Відмінність між вказаними ізозимами зумовлена різницею в кількості заряджених залишків.

Малатдегідрогеназа - мультимерний ензим, який складається з субодиниць, організованих у димер чи тетрамер з молекулярною масою 30-35 кДа. Кожна субодиниця МДГ містить динуклеотид-зв'язуючий домен, який подібний за послідовністю і структурою з іншими нікотинаміднуклеотид-залежними ензимами [68, 69]. Всі малатдегідрогенази є НАД-залежними, крім ензиму хлоропластів, який вимагає як кофактор НАДФ. Різні ізозими кодуються в генах ядра, синтезуються на цитоплазматичних рибосомах. Після синтезу цМДГ залишається в цитоплазмі, а мМДГ імпортується в мітохондріальний матрикс [70]. Цитозольна МДГ є гомодимер, кожна субодиниця має молекулярну масу 35 кДа і містить 332 амінокислотні послідовності [71]. Одна з найбільш суттєвих відмінностей між цМДГ і мМДГ є різниця в заряді ензимів: цМДГ характеризується більшим зарядом, ніж мМДГ.

Цитоплазматична МДГ перетворює оксалоацетат в малат, а мМДГ, навпаки, малат в оксалоацетат. Внаслідок цього забезпечується постачання з цитозоллю в мітохондрії субстрату та його включення в ЦТК. Одночасно в процесі перетворення оксалоацетату в малат за участі малатдегідрогенази (цМДГ) і глутаматоксалоацетаттрансамінази з цитоплазми в мітохондрії постачається НАДН для ресинтезу АТФ з одночасною генерацією в цитоплазмі НАД^+ для забезпечення подальшого метаболізму глюкози та лактату [72].

При цьому продукт реакції оксалоацетат відіграє важливу роль у багатьох метаболічних шляхах, в тому числі, в функціонуванні циклу трикарбонових кислот, синтезі амінокислот, глюконеогенезі, підтриманні балансу між окисненням / відновленням, сприяє обміну метаболітів між цитоплазмою і

субклітинними органелами. МДГ в мітохондріях контролює доступність оксалоацетату, вміст якого визначає активність циклу Кребса [73].

1.2. Активні форми Оксигену і ензиматична ланка антиоксидантного захисту клітин

Активні форми Оксигену (АФО) беруть участь у фізіологічних функціях відтворення, таких як дозрівання ооцитів, стероїдогенез, функціонування жовтого тіла і лютеоліз, запліднення, ембріональний розвиток і вагітність [74]. В процесі окисного метаболізму як у фолікулах, так і його структурних компонентах, зокрема в клітинах гранульози, зростає інтенсивність утворення АФО, які є найголовнішим індуктором ушкодження клітин [75].

Активні форми Оксигену та азоту включають супероксид аніон-радикали, гідроксил радикал, Гідрогену пероксид (H_2O_2), пероксинітрит, оксид азоту та інші. Вони утворюються через потік електронів з внутрішньої мітохондріальної мембрани у процесі окисного фосфорилування і ресинтезу АТФ. В стероїдогенних тканинах, таких як яєчник, цитохром P_{450} також є джерелом АФО [76]. Окиснювальні і нітрозактивні ушкодження виникають, коли активні форми азоту і кисню вступають в реакцію з ліпідами, білками і нуклеїновими кислотами клітин [77], що зумовлює окисний стрес, дисбаланс окисно-відновних процесів, ушкодження макромолекул клітин [78].

Для захисту від процесів вільнорадикального окиснення і для знищення АФО у клітинах існує система антиоксидантного захисту, яка складається з двох ланок - неензиматичної і ензиматичної. Зокрема, для підтримання фізіологічних рівнів АФО в клітинах гранульози і ооцитах на всіх стадіях розвитку фолікулів і у фолікулярній рідині містяться природні антиоксиданти й існує ензиматична ланка антиоксидантного захисту [79]. До складу перших входять низькомолекулярні сполуки такі, як вітамін Е, аскорбінова кислота, глутатіон та інші. Зокрема, вітамін С присутній в мілімолярних концентраціях в клітинах яєчників і 50-200 мкмоль в фолікулярній рідині людини [80, 81]. Він

виявлений в клітинах гранульози, теки, жовтого тіла і ооциті [82, 83]. Аскорбінова кислота безпосередньо реагує з АФО знищуючи їх, як це роблять токофероли (вітамін Е). Ще одною низькомолекулярною сполукою, яка бере участь у знищенні вільних радикалів є глутатіон (GSH). Це цистеїнвмісний трипептид, який є одним із ключових антиоксидантів, що виявляється в клітинах у мілімолярних концентраціях. GSH виявлений в концентрації 3-4 нмоль / мг тканини чи близько 40-50 нмоль / мг білка в яєчниках дорослих щурів і мишей [84, 85]. Він може знищувати вільні радикали в наслідок прямої взаємодії або шляхом перетворення пероксидів за участі глутатіонпероксидази, з переходом відновленої форми (GSH) в окиснену (GSSG). Встановлено, що гранульоза здатна синтезувати GSH і захищати від АФК ооцити, зокрема ДНК, від ушкоджень [86, 87].

До ензиматичної ланки антиоксидантного захисту клітин належать: супероксиддисмутаза (СОД), глутатіонпероксидаза (ГПО) і каталаза (КАТ). Вказані ензими формують ланцюг перетворення активних форм кисню в нетоксичну сполуку - H_2O .

Супероксиддисмутаза (КФ 1.15. 1. 1.; СОД) це оксидоредуктаза, що каталізує реакцію дисмутації супероксиданіон радикалу в пероксид Гідрогену і молекулярний кисень [88]. СОД є першою ланкою захисту від токсичних АФО. Супероксиддисмутаза належить до металопротеїнів, а в каталітичному центрі присутні Mn, Cu і Zn. У клітинах існує три генетично зумовлені ізоформи ензиму: мітохондріальна - MnСОД є гомотетрамером з ММ 80 кДа (20 кДа - одна субодиниця) в активному центрі містить іон марганцю і локалізована тільки в матриксі мітохондрій; цитоплазматична - Cu,ZnСОД є димером з ММ 32 кДа, що складається з двох однакових субодиниць (ММ 16 кДа) зв'язаних гідрофобними та електростатичними взаємодіями [89, 90] в активному центрі виявляються Cu^{2+} і Zn^{2+} ; позаклітинна (екзоцелюлярна) Cu,ZnСОД (ЕЦ-СОД) - гомотетрамер з ММ 135-140 кДа (35 кДа – одна субодиниця) - глікопротеїн, що має високу спорідненість до глікозаміногліканів, таких як гепарин та гепарансульфат [91].

Активність MnСОД залежить від рН середовища і знижується при значеннях нижче нейтральних, а Cu,ZnСОД - за рН середовища в межах 5-9 не змінюється. Ензими відрізняються між собою за чутливістю до ціаніду, азиду та Гідрогену пероксиду, які інгібують тільки Cu,ZnСОД, тоді як MnСОД не чутлива до дії Гідрогену пероксиду.

Встановлено, що вказані генетично визначені ензими неоднорідні і при дослідженні електрофорезом в поліакриламідному гелі проявляються різними за рухливістю смугами протеїнів - ізозимами, які характеризуються СОД-активністю [92]. В клітинах гранульози і теки виявлені цитозольна Cu,ZnСОД і мітохондріальна MnСОД [93], а у фолікулярній рідині - позаклітинна ЕЦ-СОД [94].

Встановлено, що *in vitro* за додавання СОД і КАТ затримується розрив фолікула, а самки мишей у яких був відсутній ген, що кодує утворення СОД1, були безплідні, яєчники мали менше число передовуляторних фолікулів і жовтих тіл [95, 96]. Автори припускають, що ці миші були субфертильні через порушення розвитку фолікулів чи овуляції. Однак, іншими дослідженнями не підтверджено гістологічних змін та порушень овуляції у самок з дефіцитом Cu,ZnСОД, оскільки число овульованих фолікулів було однакове. Одночасно виявлено, що у мишей збільшилась постімплантаційна ембріональна смертність [97], а нокаут гена MnСОД призводив до порушення статевого дозрівання.

Зниження антиоксидантного захисту й підвищення процесів пероксидного окиснення відбувається в клітинах гранульози зі зростанням віку тварин і людей. Зокрема виявлено, що експресія ізоформ СОД зменшується в клітинах гранульози літніх жінок [98]. Одною з причин зростання рівня АФО є зменшення постачання кисню до фолікулів [99]. При цьому виявлено, зниження активності Cu,ZnСОД і MnСОД та підвищення ушкоджень мітохондрій, структурні зміни в яких подібні до ушкоджень органел у інших типів клітин за гіпоксії. Автори вважають, що активність ензимів антиоксидантного захисту в клітинах гранульози відіграє основну роль в знищенні $O_2^{\bullet-}$ і H_2O_2 при синтезі стероїдних гормонів.

Другою ланкою детоксикації H_2O_2 і утворення H_2O є ензими - каталаза (КАТ) і глутатіонпероксидаза (GPx; ГПО).

Глутатіонпероксидаза (КФ 1.11.1.9; GPX, ГПО) - ензим, що каталізує реакцію відновлення Гідрогену пероксиду до води і молекулярного кисню та відіграє основну роль в знищенні пероксидів з участі відновленої форми глутатіону (GSH) як донора електронів [100]. Глутатіонпероксидази зазвичай в активному центрі містять Se^- і є селенозалежними. Під час каталізу атом селену (Se^-) окиснюється пероксидом до $SeOH$. Він, своєю чергою, взаємодіє з одною молекулою відновленої форми глутатіону (Г-SH), утворюючи селеноглутатіон ($Se-SG$), який приєднує другу молекулу глутатіону. При цьому, відновлюється Se^- і утворюється окиснена форма глутатіону (GS-SG). Окиснений глутатіон може бути перетворений у відновлену форму глутатіону (GSH; GSH) глутатіонредуктазою (ГР) і NaDPH [101].

ГПО здійснює регулювання низьких, фізіологічних, концентрацій H_2O_2 у внутрішньоклітинних та позаклітинних компартментах, та відновлює, окрім H_2O_2 , гідропероксиди поліненасичених жирних кислот ліпідів, фосфоліпідів мембран та інші органічні сполуки. ГПО розглядають, як основний ензим, що регулює і підтримує на фізіологічному рівні вміст АФО [102].

Існує багато ензимів, які відносяться до сімейства протеїнів з активністю GSH-пероксидаз. У ссавців розрізняють декілька генетично зумовлених ізоформ ензиму, що є гомотетрамерними чи мономерними протеїнами для яких характерна тканинна специфічність. Зокрема, існує чотири селеновмісні ізоензими ГПО, які виявляються в організмі ссавців. Цитозольна ізоформа (ГПО1) найбільш вивчена і широко поширена в тканинах, ГПО2 локалізується в шлунково-кишковому тракті, ГПО3 присутня в плазмі і секретах придатку сім'яника, а ГПО4 експресується у високих рівнях в сім'яниках і руйнує гідропероксиди фосфоліпідів, а ГПО5 є позаклітинною ізоформою, яка регулює вміст відновленої форми Г-SH в екстрацелюлярному просторі [103, 104].

При вивченні ролі ГПО в репродуктивній функції встановлено, що GPX1-не впливає на репродуктивну функцію мишей, роль ГПО2 у відтворній функції

не відома, ГПО3 ймовірно бере участь у захисті спермійів при дозріванні в придатку сім'яника, понижена активність ГПО4 і дефіцит Se^- є одною з причин чоловічого безпліддя [105], а нестача ГПО5 призводить до зростання окисненої форми глутатіону, змін конформації протеїнів і зниження розвитку ембріонів.

Каталаза (КФ 1.11.1.6, H_2O_2 : H_2O_2 -оксидоредуктаза; КАТ) - ензим, який знаходиться переважно в пероксисомах більшості клітин ссавців, але виявляється і в інших компартментах, в тому числі, мітохондріях, цитозолі та позаклітинному просторі [106]. Каталаза руйнує виключно Гідрогену пероксид та активується, коли клітинні концентрації H_2O_2 значно вищі за фізіологічні рівні, під час, так званого, окиснювального спалаху. Такі нефізіологічні випадки окисних пошкоджень виникають за різних стресових умов, а каталаза - головний нейтралізатор стресової реакції. КАТ гомотетрамерний ензим, що складається з чотирьох ідентичних субодиниць (М. в. ~ 60 кДа, ~ 500 амінокислотних залишків), кожна з яких зв'язана з молекулою гему та НАДФН. Оптимум рН ензиму ссавців знаходиться в широких межах від 4 до 11. Каталаза, залежно від концентрації H_2O_2 , характеризується двома ензиматичними активностями. Якщо концентрація пероксиду висока, ензим відновлює H_2O_2 до H_2O і O_2 (каталазна реакція). Однак, за низьких концентрацій H_2O_2 і за присутності донорів Гідрогену, каталаза діє як пероксидаза, розкладає H_2O_2 та окиснює, при цьому, другий субстрат (пероксидазна реакція) [107]. Швидкість каталітичної реакції обмежується тільки швидкістю дифузії пероксиду Гідрогену. Іони металів такі як, Cu та Zn можуть діяти на ензим як неконкурентні інгібітори, а ціаніди як конкурентні, утворюючи з гемом міцний стабільний комплекс.

Вивченням каталази виявлено, що в клітинах гранульози з великих (> 6 мм) фолікулів яєчників кіз активність ензиму в три рази вища, порівняно з клітинами малих (< 3 мм) і середніх (3-6 мм) [108]. Активність каталази при культивуванні клітин гранульози значно стимулювалась додаванням FSH. При цьому, мінімальна ефективна доза, яка стимулює активність каталази і секрецію естрадіолу клітин гранульози з малих і середніх фолікулів - 100 нг / мл, а з

великих - 200 нг / мл. При додаванні FSH і з підвищенням активності каталази в культурі клітин значно зростає утворення естрадіолу гранульозою.

Активність каталази у фолікулах яєчників величина не постійна і змінюється залежно від багатьох факторів (віку, фізіологічного стану організму і яєчників та ін.). Зокрема, активність ензиму знижується в фолікулярній рідині літніх жінок. Поряд з цим виявлені особливості активності ензиму залежно від стану організму жінок. Так, активність каталази була вища в фолікулярній рідині пацієнтів з ожирінням, порівняно з неогрядними [109]. Підвищена активність КАТ в фолікулярній рідині жінок з ожирінням може свідчити про посилений антиоксидантний захист проти зростаючих рівнів АФО.

У фолікулах були виявлені внутрішньоклітинні форми СОД, як і каталази. Ймовірно антиоксидантні ензими в фолікулярній рідині з'являються при руйнуванні чи відмиранні клітин гранульози, оскільки після стимулювання функції яєчників та ожирінні від 20 до 40 % клітин були апоптичні [110, 111].

1.3. Особливості синтезу стероїдних гормонів клітинами гранульози

Відомо, що стероїдогенез клітин теки, гранульози і жовтого тіла залежить від фолікулостимулюючого (FSH) і лютеїнізуючого гормонів (LH), які діють через цАМФ, стимулюючи гени для синтезу гормонів та нормального розвитку фолікулів і жовтого тіла *in vivo*. Відповідно, для стимулювання метаболізму клітин гранульози потрібний рецептор (FSHR) FSH, через який забезпечується вплив на аутокринні/паракринні чинники і утворення естрогенів у фолікулах [112].

Джерелом біосинтезу естрогенів є ацетат чи холестерин ліпопротеїнів, які надходять до яєчника з кров'ю *in vivo*. А за культивування інтенсивність їх утворення клітинами залежить від компонентного складу середовищ (біологічно активних сполук, протеїнів, ліпідів, мікроелементів та ін.). Зокрема, для культивування гранульози з фолікулів яєчників корів найчастіше використовують ембріональну сироватку телят (FBS; 2,5 і 10 %), бичачий

сироватковий альбумін (0,1 %), еструсну сироватку корів (10 - 25 %), синтетичні замінники сироватки (1 % Nutridoma, 2 % UltroSer G), ліпопротеїни (0,25 %), 1 мкМ андростенодіон, 1 мк/мл інсулін, селен (Se; 10 нг/мл), ДМЕМ (Dulbecco's Modified Eagle's medium):ХЕМ F-12 (Ham's F-12) (1:1). Особливими умовами за яких культивуються клітини гранульози є атмосфера - концентрація O_2 від 5 до 20 %, при оптимумі 5 % [113].

В синтезі стероїдів беруть участь FSH і LH, які визначають перші етапи синтезу, а також ензими - ароматази, які перетворюють андрогени (андростендіол і тестостерон) в естрогени (естрадіол і естрон). В клітинах теки за дії LH синтезуються андрогени, які в клітинах гранульози ароматизуються в естрогени. Цю теорію підтверджують дані про високий вміст ароматаз в гранульозних клітинах дозріваючого фолікула, а також високий (в 1000 разів більше, ніж у периферійній крові) вміст естрадіолу в фолікулярній рідині [114]. LH стимулює стероїдогенез клітин гранульози і диференціювання фолікула в передовуляторний [115]. При цьому, перехід від росту до диференціювання клітин гранульози у передовуляторному фолікулі активується LH-стимульованим нагромадженням внутрішньоклітинного цАМФ в середині статевого циклу. Однак, гіперсекреція LH, андрогенів та інсуліну негативно впливає на розвиток та дозрівання фолікула, що проявляється високою концентрацією цАМФ в клітинах гранульози [116].

Андрогени потрібні як субстрат для FSH-залежного процесу біосинтезу естрогенів. Одночасно Т4 разом з естрогенами контролюють ріст клітин гранульози. Зокрема у самок тестостерон (Т) є попередником утворення естрадіолу (Е2) [117]. В фолікулах яєчників (in vivo) - ооциті, клітинах гранульози і теки виявлено мРНК рецептора і сам рецептор тестостерону [118, 119]. У яєчниках приматів, корів і овець мРНК рецептора андрогену присутня в ооциті, клітинах теки фолікулів і гранульози, з найінтенсивнішим проявом клітинах гранульози пре- і антральних фолікулів, але відсутній в первинних фолікулах статевої залози корів [120, 121, 122]. Одним із чинників, який регулює вміст рецепторів є ооцит, оскільки інтенсивний їх прояв

спостерігається у гранульозі біля статевої клітини і зменшується у напрямку порожнини фолікула [123].

В малих антральних фолікулах, введення тестостерону збільшує мРНК рецептора в клітинах гранульози і теки та позитивно корелює зі збільшенням мРНК FSHR FSH і негативно - з апоптозом [124]. Оскільки тестостерон може зумовити FSH-подібний вплив з підвищенням ароматазної активності і збільшення цАМФ [125, 126], можливо, зниження рецепторів тестостерону в зрілих фолікулах необхідне для зменшення впливу андрогенів на ріст і атрезію фолікулів.

При введенні приматам Т збільшується вміст мРНК FSHR у первинних фолікулах [127]. Подібно, дегідротестостерон (DHT) збільшує вміст FSHR в передовуляторних фолікулах [128]. Тестостерон збільшує чутливість фолікулів щурів до дії FSH [129], а андростенодіон стимулює диференціювання клітин гранульози фолікулів яєчників корів зі збільшенням активності ароматази і утворення E2 [130].

Додавання FSH і Т чи DHT до клітин гранульози з маленьких антральних фолікулів приматів підвищує інтенсивність стероїдогенезу, а додавання андрогенів до клітин гранульози з великих антральних фолікулів гальмує активність ароматази, яка стимулюється FSH [131].

Прижиттєво Т індукує атрезію фолікулів, яка характеризувалась регенераційними змінами в ооциті і пікнозом клітин гранульози [132], а DHT і Т підвищують атрезію клітин в яєчниках щурів [133]. Тестостерон гальмує антиапоптичний вплив E2 в клітинах гранульози преантральних і антральних фолікулів яєчників щурів [134], а високий рівень рецепторів андрогену пов'язаний зі збільшенням атрезії клітин в пізніх антральних фолікулах [135].

Відомо, що FSH [136] і E2 [134] служить чинником виживання фолікулів з пізньої передантральної до ранньої антральної стадії за рахунок стимулювання FSH-залежного синтезу E2. Естроген в природних умовах локалізується в клітинах гранульози фолікулів яєчників щурів. При цьому, в антральних фолікулах встановлений рецептор естрогену (ER). Було виявлено,

що в клітинах гранульози існує мРНК, яка специфічна для ER α (доменів E і F) [137]. Встановлено, що для ER існує дві ДНК, відповідно, ER α ДНК і ER β ДНК [138, 139, 140, 141, 142]. У яєчниках щурів ER β локалізована в клітинах гранульози фолікулів як первинних, так і передовуляторних стадій [143, 144]. При цьому, експресія гена ER β ДНК в яєчнику гризунів і культурі клітин гранульози може залежати від LH/hCG [145]. В загальному, клітини гранульози містять переважно ER β , а ER α - у теці та інтерстиції [146]. У жінок обидва гени ER утворюють мРНК-ізоформи, які, своєю чергою, характеризуються диференціальною, залежною від локалізації, експресією у тканинах [147]. ER β локалізується в ядрах клітин гранульози малих, середніх і великих фолікулів, теки і жовтих тіл. ER α , своєю чергою, зі слабкою інтенсивністю проявляються у клітинах гранульози і не виявляються в клітинах теки чи жовтих тіл [148, 149 150].

Відомо, що стероїди виконують функцію шляхом зв'язування з рецепторами ядра з подальшим активуванням транскрипції генів і синтезу протеїнів. Однак, крім вказаного шляху існує можливість дії естрогенів через неklasичні форми неядерних ER чи через опосередковану дію [151, 152, 153].

У відповідь на дію LH клітини гранульози з фолікулів діаметром 9-10 мм нормальних яєчників виділяють E і прогестерон (P), а при полікістозі яєчників - секреція вказаних гормонів відбувається у гранульозі з малих фолікулів (до 4 мм) [154]. Клітини гранульози через 48 год культивування проявляли дозозалежну стимуляцію стероїдогенезу за додавання чи відсутності FSH [155]. При цьому, підвищення концентрації 17 β -естрадіолу пов'язано зі збільшенням FSH і цАМФ. Механізми, що лежать в основі таких синергічних взаємодій естрадіолу характеризуються підвищенням вмісту рецепторів ЛПНЩ, поглинанням і використанням холестерину [156], зростаючою активністю цитохрому P_{450sc} [157, 158], підвищенням перетворенням прегненолона в прогестерон, синтезом de Novo холестерину клітинами за участі 3-гідрокси-3-метил-глутарил-коензим А-редуктази [159] і синтез стероїдогенних

регуляторних протеїнів без очевидного інгібування метаболізму прогестерону до 5-дигідропрогестерону [160].

Перетворення у фолікулі естрогенів / андрогенів до прогестерону зумовлено зміною співвідношення 3β -HSD:P450c17 на користь синтезу прогестерону [161]. Експресія стероїдогенних ензимів характеризує перетворення естрогену до прогестерону у фолікулах. При цьому мРНК, експресія стероїдогенних ензимів пов'язаних зі синтезом і метаболізмом прогестерону в першу чергу регулюються гонадотропінами, однак поглинання і використання холестерину та його перетворення у стероїди можна модулювати у клітинах гранульози [162].

Прогестерон (P4) стероїдний гормон, який синтезується в яєчниках і концентрація якого залежить від рівня стимуляції гонадотропінів та фізіологічного стану яєчника. Крім того, клітини гранульози, теки і стромы та лютеїнові клітини також виділяють різні рівні P4 [163, 164]. Після утворення прогестерону його дія на репродуктивні органи здійснюється через механізм, який включає два рецептори ядра P4 (PGR-A і PGR-B) [165, 166, 167]. Ген, що регулює транскрипцію цих рецепторів забезпечує біологічну дію P4 [168]. Прогестерон синтезується в яєчниках у великих кількостях і впливає на внутрішньооваріальну функцію [169]. Поряд з регулюванням секреції лютеїновими клітинами, P4 впливає на функції клітин гранульози, зокрема тих, які стосуються росту фолікулів [170]. Клітини гранульози, як і лютеїнові, у гризунів експресують PGR до стимулювання гонадотропінами овуляції [171]. Прогестерон інгібує розвиток фолікулів яєчника про що свідчить негативна кореляція між рівнем P4 в сироватці крові і швидкістю росту фолікулів (тобто швидкістю мітозу клітин гранульози) [172, 173].

Оскільки P4 інгібує проліферацію клітин гранульози в природних умовах, незалежно від здатності впливати на рівень гонадотропінів, ймовірно, гормон діє безпосередньо на клітини гранульози. Доведено, що прогестерон активує секрецію P4 клітинами гранульози та інгібує утворення естрогенів [174, 175] і уповільнює швидкість мітогеніндукованої проліферації [176, 177]. Крім того P4

запобігає апоптозу клітин гранульози [178, 179, 180, 181]. В наслідок впливу гонадотропінів, овуляції та через активування гену PGR гранульоза передовуляторних фолікулів диференціюється в лютеїнові клітини [182, 183]. P4 пригнічує апоптоз лютеїнових клітин [178, 184, 185, 186].

В гранульозі і клітинах жовтого тіла прогестерон регулює стероїдогенез, мітоз і апоптоз. Дослідження мишей у яких відсутні рецептори прогестерону (PGR-A/PGR-B) показали, що PGR необхідний під час овуляції. Це узгоджується з висновками, що PGR виявляється тільки в клітинах гранульози після дії гонадотропінів, а розвиток фолікулів протікає фізіологічно нормально [187]. Клітини гранульози незрілих фолікулів реагують на P4 залежно від дози [188]. PGR рецептори можуть бути залучені в опосередковані дії P4 в клітинах гранульози перед хвилиною гонадотропінів. Лютеїнові клітини, отримані від тварин, у яких короткий естральний цикл, не проявляють PGR [189, 190].

Одним із протеїнів, який бере участь в регулюванні дії прогестерону на яєчник є SERBP1. Він був виявлений при блокуванні антитілом рецептора PGR [191]. Цей білок (ММ 55-60 кДа), локалізується на зовнішній поверхні плазматичних мембран клітин гранульози щура і проявляє антиапоптичну дію. SERBP1 проявляється в клітинах теки і строми фолікулів яєчників і лютеїнових клітин. Крім того, його рівень збільшується в межах клітин гранульози під час розвитку фолікулів. Підвищена експресія SERBP1 підвищує здатність клітин гранульози реагувати на P4 [192].

Стероїдогенез модулюється, крім гонадотропінів, ще й факторами росту [193]. Доведено існування інсуліноподібних факторів росту (IGF-I і -II), що утворюються в печінці під впливом гормону росту і, можливо, в клітинах гранульози фолікула, де IGF-1 бере участь в процесі синтезу естрадіолу [194]. За культивування гранульози з гонадотропним гормоном чи при поєднанні естрогену з FSH синтезується IGF, який стимулює їх проліферацію [195]. Крім того, IGF-1 з естрогеном (окремо чи разом з FSH) здатні збільшувати індекс проліферації клітин *in vitro*, індукувати ядерний антиген проліферації клітин та збільшувати вміст ДНК [196]. IGF-I, IGF-II та інсулін є важливими

регуляторами проліферації клітин гранульози, диференціювання та стероїдогенезу [197]. Показано, що IGF-II опосередковує ефекти FSH на синтез естрогенів клітин гранульози у передантральних фолікулах людини [198]. Експериментами на клітинах яєчників виявлено, що IGF та інсулін діють синергічно з FSH і сприяють утворенню стероїдів та росту фолікулів. Аналогічно, виявлено стимулюючий ефект IGF-I, IGF-II та інсуліну на стероїдогенез клітин гранульози з жовтого тіла [199].

Інсуліноподібний фактор росту та інсулін модулюють стероїдогенез і мітотичну активність яєчників [200]. Повна система IGF включає IGF-протеїни, IGF-рецептори, IGF-зв'язуючі протеїни і IGF-зв'язуючий білок протеази [201, 202, 203]. Вважається, що IGF-стимулювання стероїдогенезу здійснюється через клас рецепторів типу IGF1 тирозинкінази клітинної поверхні, а інсулін проявляє дію через свій власний рецептор [204]. Стимулюючі ефекти IGF на стероїдогенні клітини характеризувались збільшенням утворенням цАМФ [205], посиленням поглинанням ліпопротеїнів і стимулюванням активності та експресії ензимів стероїдогенезу, в тому числі, відщеплення бічного ланцюга холестерину - P_{450} і 3β -гідроксистероїддегідрогенази [206].

Дія IGF та інсуліну, як модуляторів передачі холестерину до внутрішньої мітохондріальної мембрани є стадією, що лімітує швидкість утворення стероїдних гормонів [207] і здійснюється через стероїдогенний регуляторний білок (StAR). Стероїдогенний регуляторний білок стимулює транслокацію холестерину з стеролів зовнішніх мембран мітохондрій до холестерину внутрішньої мітохондріальної мембрани, де система відщеплення бічного ланцюга P_{450} перетворює його в прегненолон [208]. Перетворення холестерину в прегненолон є першим кроком у біосинтезі стероїдних гормонів. Крім того, індукцію експресії гена StAR в клітинах гранульози жовтого тіла людини корелює з можливістю продукувати прогестерон. Функцію StAR можна модулювати шляхом цАМФ-направленого фосфорилування серину 195 [209]. Ця пост- або ко-трансляційна зміна може пояснити регулювання стероїдних гормонів цАМФ.

Стероїдогенний процес, у тому числі мРНК StAR і експресію протеїну StAR, через цАМФ шлях регулюють гормони LH / HCG [208, 210].

У проліферуючих клітинах гранульози жовтого тіла IGF-I та інсулін збільшує експресію мРНК StAR за допомогою пост-транскрипційних механізмів. Відомо, що додавання IGF-I збільшує стабільність мРНК рецептора ЛПНЩ в клітинах гранульози свиней [211].

Ефекти інсуліну на експресію StAR і синтез прогестерону узгоджуються з результатами, які свідчать про вищу стимулювальну дію IGF-I на стероїдогенез передовуляторних клітин гранульози, ніж інсуліну [212]. При цьому, стероїдогенний ефект інсуліну проявляється при низьких дозах (20 нмоль / л). Дослідженнями ізольованих клітин гранульози виявлено, що інсулін значно збільшує дію LH на стероїдогенез, що може привести до генерації «преовуляторних» концентрації цАМФ в межах клітин і зумовити передчасно їх диференціювання [213]. У клітинах гранульози людини інсулін, за відсутності гонадотропінів, стимулює секрецію естрадіолу і прогестерону [214].

Ще одним із факторів росту, які впливають на перебіг біохімічних процесів та визначають фізіологічні особливості гранульози є протеїни BMP (морфогенетичні протеїни кістки). Ліганди BMP, їх рецептори і специфічні протеїни виявлені за нормального еструсного циклу і всі компоненти вказаної системи були присутні в клітинах яєчника [215]. Виявлено, що система BMP відіграє визначальну роль в репродуктивній функції самок ссавців, регулюванні стероїдо- і мітогенезів у клітинах гранульози [216, 217].

У клітинах гранульози фолікула протеїни BMP контролюють передачу сигналів за стимулювання FSH. При цьому, виділені з теки фактори BMP4 і BMP7, за індукції FSH, підвищують синтез естрадіолу і гальмують утворення прогестерону в первинній культурі клітин гранульози щурів [218]. Дія BMP2 в первинній культурі клітин гранульози вівці стимулює стероїдогенез, подібно до BMP4 і BMP7 в гранульозі щурів [219]. BMP6 в клітинах гранульози за стимулювання FSH гальмує синтез прогестерону через зменшення синтезу клітинного цАМФ [220]. Інший фактор BMP15, який міститься в значних

кількостях в ооцитах гальмує дію FSH, зменшуючи вміст FSHR FSH [221]. Крім того, фактор диференціювання і росту 9 (GDF9), подібно до BMP15, гальмує FSH-індукований стероїдогенез і зменшує кількість рецепторів LH в клітинах гранульози щурів [222].

Одночасно, компоненти BMP, в тому числі й активність генів, змінюються впродовж фолікулогенезу [223]. Тому, існуючий зв'язок між системою BMP і FSH-цAMP забезпечує ефективний ріст фолікулів, а їх взаємодія підсилює ефекти BMP і FSH. Виявлено, що у незрілому яєчнику миші введення FSH і LH збільшує вміст молекул TGF β , зокрема TGFBR1 (відомий як ALK5), TGFBR2, SMAD2 і 4 зі зменшенням SMAD6 [224]. Це вказує на взаємодію між ендogenous системою BMP/TGFI і впливом гонадотропінів.

Взаємозв'язані чинники FSH-цAMP і системи BMP гальмують утворення прогестерону шляхом зниження StAR і FSHR. Зв'язок між BMP і FSH-цAMP важливий для підтримки росту і диференціювання клітин гранульози. BMP пригнічують FSHR в клітинах, що модулює чутливість рецептора до лігандів BMP і FSH та визначає метаболізм гранульози за розвитку фолікула [225].

Крім цього, для існування клітин гранульози важливим є присутність протеїнів, які забезпечують їх чутливість до гонадотропних гормонів і відповідну зміну метаболічної активності. До значного числа біологічно активних протеїнів належать трансформуючі фактори росту (TGF β), зокрема, декілька протеїнів TGF β , Nodal (фактор росту 7,5 добового ембріону миші), а також фактори росту і диференціювання (GDFs) [226, 227].

Трансформуючі фактори росту (TGF β) - багатофункціональні протеїни, які регулюють ріст і диференціювання, позаклітинну матричну модифікацію, ангиогенез, апоптоз та імунодепресію клітин [228, 229]. Протеїни TGF β здійснюють свою функцію, зв'язуючись зі зовнішньоклітинними рецепторами типів I і II, формують потрійний ліганд–рецепторний комплекс [230]. У ссавців виявлено існування п'яти рецепторів типу II і сім типу I [231]. Після фосфорилування рецептора типу II, фосфорилується рецептор I і активує протеїни Smads, які є внутріклітинними сигнальними молекулами для TGF β .

Smad2 і Smad3 відповідають на дію TGF β , активіну, Nodal і Lefty, а Smad, Smad5 і Smad8 передають сигнали з BMP [232]. Фосфорильовані Smad звільняються від рецепторів та формують олігометричні комплекси спільно з Smad4, і переміщуючись до ядра, регулюють транскрипцію цільових генів.

Nodal і його рецептор типу I - ALK7 виявляється в клітинах гранульози і залежить від стадії фолікулогенезу. За антрального зростання, ALK7 найбільше виявляється в клітинах гранульози, а вміст Nodal зменшується зі збільшенням розміру фолікула, коли гранульоза здатна піддатися апоптозу і атрезії (завдяки присутності ALK7). Проте, в зв'язку з низьким рівнем його ліганду процес загибелі клітин гальмується. Протягом зниження дії гонадотропінів, антральні фолікули атрезують з підвищенням рівня Nodal і збільшенням як ліганду, так і його рецептора в клітинах гранульози. Крім того, відносно підвищення мРНК Nodal значно більше в клітинах гранульози атретичних, ніж неатретичних антральних фолікулів. Встановлений факт дає підстави вважати, що збільшення Nodal в клітинах гранульози є фізіологічним сигналом для стимулювання атрезії. Nodal або ALK7 активує зниження в клітинах гранульози X-зв'язаного інгібітора апоптозу (XIAP) мРНК [233].

XIAP є детермінант виживання клітин гранульози та фолікулярного росту [234] і є внутрішньоклітинним антиапоптичним протеїном, який функціонує як прямий інгібітор каспаз-3, -7 [235] і -9 [236]. Крім того, XIAP може зв'язуватися з Smac/DIABLO і HtrA2/Omi гальмуючи апоптоз [237].

1.4. Вибір напрямку досліджень

Як впливає з аналізу джерел літератури клітини гранульозного шару фолікулів яєчників здатні виживати за умов культивування. При цьому, гранульоза не втрачає одну з головних властивостей - синтезувати стероїдні гормони [46, 238, 239]. Здатність до утворення гормонів клітинами залежить від компонентного складу середовищ культивування - дії гонадотропних гормонів, а також присутності субстратів - ЛПДНЩ чи ЛПНЩ [239, 240, 241, 242]. Крім

того, для свого існування гранульоза засвоює цукри та інші субстрати, які використовуються для ресинтезу АТФ та інших метаболічних процесів, проявляє дихальну активність і відновну здатність [12, 48, 238, 243, 244]. Одночасно за перебігу окисних процесів і окиснення як ліпідів та їх компонентів (ненасичених жирних кислот), так і протеїнів утворюються активні форми Оксигену [245, 246, 247], що призводить до руйнування мембран і загибелі клітин. Для захисту від надлишкової кількості утворених АФО і запобігання нагромадження недоокиснених цитотоксичних продуктів в гранульози існує система АОЗ - неензиматична і ензиматична ланки антиоксидантного захисту [98, 248, 249, 250, 251]. Ефективність функціонування останньої залежить від інтенсивності нагромадження АФО, здатності синтезувати протеїни з вказаною ензиматичною активністю, присутності кофакторів [79, 252, 253]. Однак, в доступних джерелах літератури існують неоднозначні розрізнені дані (а окремі фактори взагалі не враховані) щодо ролі інтенсивності окисних процесів у існуванні клітин гранульози, забезпечення енергетичними субстратами для ресинтезу АТФ і утилізації АФО, здатності використовувати та утворювати протеїни *in vitro* й залежності стероїдогенезу від вище наведених процесів. Отже, вивчення особливостей окисних процесів з дослідженням здатності клітин гранульози за культивування використовувати субстрати та ресинтезувати АТФ, утворювати *de novo* протеїни і стероїдні гормони, а також, в процесі метаболічних перетворень, захищати свої структурні компоненти від утворених цитотоксичних продуктів є необхідне для виявлення особливостей регулювання окисного метаболізму в клітинах гранульози фолікулів за різних фізіологічних станів яєчників та можливості керування вказаними процесами. Крім того, здатність клітин гранульозного шару фолікулів утворювати статеві гормони за культивування є важливим для практичного використання середовищ як компонентів для виготовлення препаратів зі стимулювання відтворної функції самок.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Відбір матеріалу та схема проведення досліджень

Дослідження з теми дисертаційної роботи проведені протягом 2009 - 2015 років в лабораторії молекулярної біології та клінічної біохімії Інституту біології тварин НААН і м'ясопереробних підприємствах: «Прикарпаття» та ТзОВ «Пустомитим'ясо» та СВК «Урожай». Для проведення досліджень після забою корів відбирали яєчники. Статеві залози оцінювали візуально і за фізіологічним станом ділили на групи: з "свіжою" овуляцією, на місці овульованого фолікула є відтулина, жовте тіло відсутнє або діаметр до 5 мм, колір червоний (СО; n = 14); з "раннім" жовтим тілом, діаметр 10–20 мм, колір червоний або брунатний (РЖТ; n = 41); з "пізнім" жовтим тілом, діаметр 5–15 мм, колір жовтий (ПЖТ; n = 32); "фолікулярного росту", без жовтого тіла (ФР; n = 84).

Використовували яєчники корів з фолікулами малими (< 4 мм), середніми (4 – 7 мм) і великими (> 7 мм) [254]. З фолікулів вказаних діаметрів, шляхом аспірації, 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; Sigma) і RPMI-1640 з додаванням (в мас. %): еструсної сироватки корів 8-12 %; фолікулярної рідини - 10-12 %, інсуліну (4 мкг/мл), гепарину (5 тис. од.) – 0,001 - 0,0015 мл). Отриману суспензію клітин гранульози вносили у планшети (діаметр лунок 3 см) і культивували у вищевказаних середовищах протягом 38 - 40 діб у герметично закритому ексікаторі при 5,0 % CO₂, 100 % вологості і температурі 38,5°C. Через кожні 7 діб проводили заміну 2/3 середовища.

Матеріалом для досліджень були клітини гранульозного шару фолікулів та середовища культивування. Загальна схема досліджень наведена на рис. 2.1.

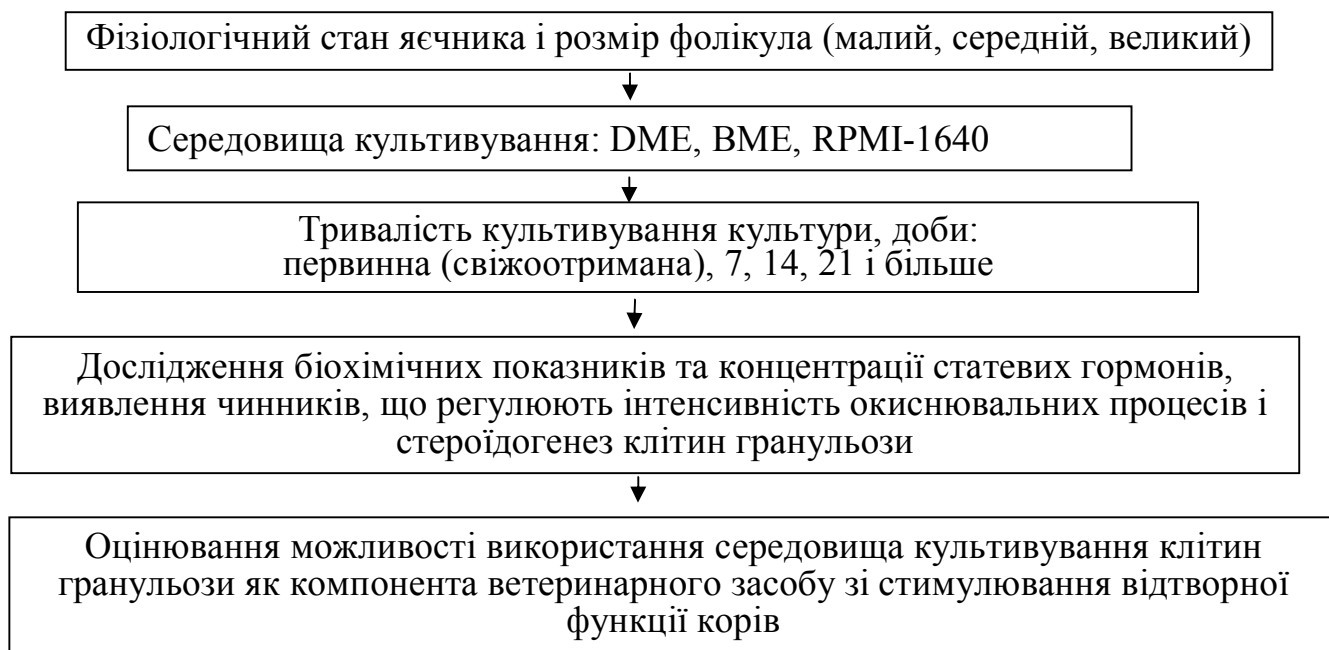


Рис. 2.1. Загальна схема досліджень

У культурі гранульози при постановці на культивування, через 7, 14, 21 та більше 21 діб (38 - 40 діб) визначали: кількість клітин підрахунком на сітці в камері Горяєва (10^6 клітин/мл), біохімічні показники і концентрацію статевих гормонів.

2.2. Дослідження біохімічних показників

Для досягнення мети дисертаційної роботи досліджували біохімічні показники: вміст загального білка, спектр розчинних та структурних протеїнів, дихальну активність та відновну здатність клітин гранульози, активність і вміст ізоформ ензимів антиоксидантного захисту (СОД, КАТ, ГПО), лактат- і малатдегідрогеназ (ЛДГ і МДГ) та концентрацію статевих гормонів (естрадіол, прогестерон і тестостерон).

2.2.1. Визначення дихальної активності та відновної здатності клітин гранульози. Інтенсивність споживання кисню є одною із важливих характеристик метаболізму клітин, який свідчить про інтенсивність ресинтезу АТФ та вільнорадикального окиснення. При цьому, баланс між утворенням макроергічних сполук та руйнуванням й перебудовами структурних елементів

визначає існування та продуктивність (утворення біологічно активних сполук) клітин. Поряд з цим, в клітинах не тільки використовуються субстрати, відбувається їх конверсія в цитозолі та мітохондріях, але й протікає інтенсивний обмін продуктами (субстратами, недоокисненими продуктами) між клітиною та позаклітинним середовищем. Тому, вивчали дихальну активність та відновну здатність клітин гранульози за культивування.

Інтенсивність поглинання кисню клітинами гранульози визначали полярографічно (нг-атом O/хв \times 0,1 мл суспензії клітин; СК) з використанням електрода Кларка, який вмонтований у термостатовану комірку (температура 38,5°C) об'ємом 1,0 мл [255] та відновну здатність – потенціометрично (мВ / хв \times 0,1мл СК) з використанням мікроелектродів, які вставляли в полярографічну комірку. У якості позаклітинного акцептора електронів використовували калію ферриціанід ($K_3[Fe(CN)_6]$; $K_3...$; $10^{-4}M$). Таким чином, ми мали змогу оцінювати процеси як споживання кисню, так і зміни потенціалу в середовищі культивування (транспорт електронів і протонів позаклітинний простір). Вивчення дихальної активності й відновної здатності клітин гранульози проводили за температури 38,5°C у фосфатно – сольовому буфері (ФСБ; 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; рН 7,4), для чого в термостатовану комірку вносили 0,9 мл ФСБ і 0,1 мл суспензії клітин гранульози.

2.2.2. Визначення вмісту загального протеїну та його спектру в культурі клітин гранульози. Концентрацію протеїну в культурі клітин визначали з використанням реактиву Фоліна-Чокальтеу [256]. Якісний та кількісний вміст фракцій протеїнів у культурі клітин визначали методом електрофорезу в поліакриламідному гелі (ПААГ): у 7,5 % ПААГ спектр розчинних і у 12,5 % ПААГ з додаванням 0,1 %-ного натрію додецилсульфату (ДСН) та 2-меркаптоетанолу - структурних протеїнів культури клітин.

Підготовка проб для електрофорезу: в 7,5 %-ному ПААГ - 0,1 мл суспензії клітин гранульози розбавляли 1:4 електродним буфером (рН 8,3); 0,1 мл проби змішували з аналогічною кількістю 40% сахарози, в лунки

концентруючого гелю вносили 0,02 мл (~ 150 - 200 мкг білка); в 12,5 % ПААГ - до аналогічно розбавлених проб додавали ДСН і 2-меркаптоетанол - кінцеві концентрації в пробах, відповідно, 2 і 5 %. Проби інкубували 5 хв при температурі 100°C, охолоджували, додавали 0,1 мл 40 % сахарози; в лунки концентруючого гелю вносили 0,02 мл (~ 75-100 мкг білка). Маркерний барвник - 0,01 % -ний розчин бромфенолового синього доданий в електродний буфер перед розбавленням проб. 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). Після електрофорезу гелі фіксували і одночасно фарбували в 12,5 % трихлороцтовій кислоті з 0,25 % водним розчином кумасі R 250. Кількісний аналіз і визначення вмісту протеїнів (%) проведено з використанням програмного забезпечення TotalLab V 2003.02. Приготування гелів проведено за оригінальним прописом Каплінський В. В., Остапів Д. Д.

2.2.3. Визначення активності та вмісту ізозимів лактат- і малатдегідрогеназ, ензимів антиоксидантного захисту. Активність лактатдегідрогенази визначали за швидкістю окиснення НАДН [257]. До 1,5 мл 62,5 мМ Трис-НСl буферу (рН 7,4), що містить 1,5 мМ пірувату і 6,25 мМ Na₂ЕДТА, додавали 20 мкл зразка, а в контрольну кювету дистильованої води. Після преінкубування 3 хв при 37°C, в дослідну кювету додавали 375 мкл 0,2 мМ НАДН і вимірювали абсорбцію протягом 5 хв. З урахуванням розведення біологічного матеріалу в пробі і коефіцієнту молярної абсорбції НАДН при 340 нм ($6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) розраховували активність ензиму в мікромоль використаного в реакції НАДН за формулою:

$$\frac{\Delta A * V_1}{6,22 * V_2 * C * t} = (\text{мкМ} / \text{хв} \times \text{мг протеїну}), \text{ де: } \Delta A - \text{зміна абсорбцій за хв; } 6,22 -$$

коефіцієнт мікромольної абсорбції НАДН при 340 нм; V₁ – об'єм інкубаційної суміші в кюветі, мл; С – концентрація протеїну в V₁, мг/мл; V₂ – об'єм зразка, мл, t – час інкубування, хв.

Для виявлення ізоформ ЛДГ проводили електрофорез у 7,5 % ПААГ: культуру клітин гранульози розбавляли 1:1 Трис-гліциновим буфером (рН 8,5) і додавали 0,05 мл 40 % сахарози. У лунки концентруючого гелю вносили 0,02 мл проби (концентрація протеїну 100 мкг). Після електрофорезу фарбували ПААГ за J. Garbus [258]: інкубували 60 хв в темноті при температурі 37°C 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 [259]. Як маркер ізоензимного складу використані гемолізати еритроцитів крові корів.

Активність **малатдегідрогенази** визначали за швидкістю окиснення НАДН [257]. До 2,8 мл 50 мМ Трис-НСІ буферу (рН 8,0) додавали 0,1 мл 3 мМ оксалоацетату та 0,05 мл зразка, а в контрольну кювету дистильованої води. Після преінкубування 3 хв при 37°C, в дослідну кювету додавали 0,05 мл 0,2 мМ НАДН і вимірювали абсорбцію протягом 15 хв. З урахуванням розведення біологічного матеріалу в пробі і коефіцієнту молярної абсорбції НАДН при 340 нм ($6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) розраховували активність ензиму в мікромоль використаного в реакції НАДН за формулою:

$$\frac{\Delta A * V_1}{6,22 * V_2 * C * t} = (\text{мкМ} / \text{хв} \times \text{мг протеїну}),$$

де: ΔA – зміна абсорбцій за хв; 6,22 - коефіцієнт мікромольної абсорбції НАДН при 340 нм; V_1 – об'єм інкубаційної суміші в кюветі, мл; C – концентрація протеїну в V_1 , мг/мл; V_2 – об'єм зразка, мл, t – час інкубування, хв.

Для виявлення ізоформ МДГ проводили електрофорез у 7,5 % ПААГ: культуру клітин гранульози розбавляли 1:1 Трис-гліциновим буфером (рН 8,5) і додавали 0,05 мл 40 % сахарози. У лунки концентруючого гелю вносили 0,02 мл проби (концентрація протеїну 100 мкг). Після електрофорезу фарбували ПААГ за J. Garbus [258]: інкубували 60 хв в темноті при температурі 37°C в інкубаційному середовищі: 0,1 мг/мл ФМС, 0,2 М малату, 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.

Активність **супероксиддисмутази** визначали за кількістю нітроформазау, що утворюється в реакції між феназинметасульфатом та НАДН [260]. Готували проби: до 0,05 мл зразка додавали 0,45 мл дистильованої води, 0,25 мл C₂H₅OH (99 %), 0,125 мл хлороформу, 100 мг КН₂РО₄, перемішували та центрифугували 30 хв при 4000-5000 об/хв (температура 4°C). Активність СОД визначали в супернатанті при температурі 25°C. До 1,5 мл інкубаційної суміші (12,4 мг Na₂ЕДТА, 110 мг нітротетразолію синього; Sigma, USA, N 6876, НСТ, 18,4 мг феназинметасульфату (ФМС) в 100 мл 0,15 М Na / К фосфатного буферу (рН 7,8) додавали 0,1 мл супернатанту та 0,04 мл 0,05 мМ розчину НАДН (3,1 мг НАДН розчиняли в 2 мл 1 мМ трис-ЕДТА буферу; рН 8,0). В контрольну пробу додавали 0,1 мл дистильованої води. Через 10 хв після додавання всіх реагентів вимірювали абсорбцію контрольної та дослідної проб при довжині хвилі 540 нм на спектрофотометрі СФ-46 проти дистильованої води в кюветі з довжиною оптичного шляху 1 см. Відсоток гальмування реакції утворення нітроформазау розраховували за формулою:

$$\frac{A_{\text{конт.пр.}} - A_{\text{досл.пр.}}}{A_{\text{конт.пр.}}} * 100 = \begin{matrix} \text{відсоток гальмування} & \text{реакції} \\ \text{утворення нітроформазау} & \end{matrix} ; \text{ де } A - \text{абсорбція.}$$

Активність СОД визначали за допомогою калібрувальної кривої з стандартними розчинами СОД ("Sigma", США; С1345) та виражали в МО/ мг протеїну.

Ізозими СОД виявляли після електрофорезу в 10 % ПААГ для цього зразки культури клітин розбавляли 1:4 Трис-гліциновим буфером (рН 8,5), додавали 0,05 мл 40 % сахарози. У лунки концентруючого гелю вносили 0,02 мл проби (концентрація протеїну 100 мкг). Проводили електрофорез. Фарбування пластин гелю для виявлення ізоформ СОД здійснювали методом С. Beauchamp та I. Fridovich [261] в модифікації [262, 263]: після електрофорезу пластини ПААГ інкубували в розчині 1,23 мМ НСТ в 0,15 М Na/К фосфатному буфері (рН 7,8) в темноті при кімнатній температурі. Через 15 хв ПААГ тричі промивали дистильованою водою і заливали інкубаційним середовищем: 28 мМ ТЕМЕД і 0,028 мМ рибофлавіну в 0,15 М Na / К

фосфатному буфері (рН 7,8). Через 20 хв інкубування в темноті пластини гелю промивали дистильованою водою і опромінювали 7 хв ультрафіолетом для генерації $O_2^{\bullet-}$ рибофлавіном. Пластини ПААГ набували темно-фіолетового забарвлення, окрім зон з ізоформами СОД, які залишалися прозорими унаслідок перетворення $O_2^{\bullet-}$.

Активність **каталази** визначали методом Королюк М. А. та співавт. [264]. До 2,0 мл 0,03 % розчину H_2O_2 додавали 0,1 мл зразка та інкубували 10 хв при 25 °С. Після чого додавали 1,0 мл 4 % розчину молібдату амонію в 0,01 н H_2SO_4 та зупиняли реакцію 1,0 мл 0,1 н розчину H_2SO_4 . В контрольну пробу розчин молібдату амонію додавали перед, а в зразок – після інкубування. Після центрифугування (5 хв при 4000 об/хв) в супернатанті вимірювали інтенсивність зафарбування при 410 нм на СФ-46 проти дистильованої води. З урахуванням розведення біологічного матеріалу і коефіцієнту мілімолярної абсорбції комплексу пероксиду Гідрогену з молібдатом амонію при 410 нм – 110,6 розраховували активність ензиму в мілімоль використаного в реакції субстрату (H_2O_2) за формулою:
$$\frac{\Delta A \times V_1}{110,6 \times t \times V_2 \times C} = (mM / хв \times мг протеїну);$$
 де ΔA – різниця абсорбцій контрольної і дослідної проб; V_1 – об'єм суміші в кюветі, мл; V_2 – об'єм зразка, мл; 110,6 - коефіцієнт мілімолярної абсорбції комплексу молібдату амонію з пероксидом Гідрогену при 410 нм; C – концентрація протеїну, мг/мл; t – час інкубування, хв.

Для виявлення протеїнів каталази проводили електрофорез у 7,5 % ПААГ: зразки культури клітин розбавляли 1:1 Трис-гліциновим буфером та додавали 0,05 мл 40% сахарози. У лунки концентруючого гелю вносили 0,02 мл проби (кінцева концентрація протеїну 100 мкг). Фарбування пластин гелю для виявлення протеїнів каталази здійснювали за методом W. Wodbury [265]: після електрофорезу ПААГ витримували 45 хв в дистильованій воді, насичували 10 хв 0,003 % розчином пероксиду Гідрогену, тричі промивали водою та інкубували при кімнатній температурі в темноті 15 хв в середовищі, що містило 1 % розчин ферриціаніду калію (III) та Феруму хлориду. Після фарбування

ПААГ місця локалізації протеїнів каталази проявляються яскраво-жовтими смугами на синьо-зеленому фоні. Метод виявлення КАТ дозволяє виявляти до 3×10^{-9} г протеїну в пробі.

Активність **глутатіонпероксидази** визначали з використанням реактиву Елмана [266]. До 0,83 мл інкубаційної суміші (4,8 мМ Г-SH, 6 мМ ЕДТА-Na₂ та 12 мМ азид натрію у 0,1 М Трис-HCl буфері, яку готували безпосередньо перед визначенням) додавали 0,1 мл зразка та інкубували 10 хв при 37°C; додавали 0,07 мл 20 мМ розчину гідропероксиду третинного бутилу та продовжували інкубувати ще 5 хв. Реакцію зупиняли 0,2 мл 20 % розчином трихлороцтової кислоти. Центрифугували 5 хв при 4000 об/хв. До 5 мл 0,1 М Трис-HCl буферу (рН 8,5) додавали 0,05 мл супернатанту та 0,05 мл реактиву Елмана (0,01 М розчин ДТНБК у метанолі). Через 5 хв проби фотометрували при 412 нм на СФ-46 проти дистильованої води в кюветі з довжиною оптичного шляху 1 см. У контрольну пробу зразок вносили перед осадженням протеїнів. З урахуванням розведення біологічного матеріалу в пробі і коефіцієнту мікромолярної абсорбції тіонітрофенільного аніону (ТНФА) при 412 нм ($11,4 \text{ см}^2 / \text{мкМ}$) розраховували активність ензиму в мікромоль використаного в реакції субстрату (Г-SH) за формулою:

субстрату (Г-SH) за формулою:
$$\frac{\Delta A * V_1 * V_3}{11,4 * V_2 * V_4 * C * t} = (\text{мкМ} / \text{хв} \times \text{мг протеїну}),$$
 де: ΔA –

різниця абсорбцій контрольної і дослідної проб; V_1 – $V_{\text{супернатанту}} + V_{\text{Трис/НСІ буферу}} + V_{\text{реактиву Елмана}}$, мл; V_2 – об'єм зразка, мл; V_3 – $V_{\text{зразка}} + V_{\text{інкубаційної суміші}} + V_{\text{розчину гідроперексиду третинного бутилу}} + V_{\text{розчину ТХО}}$, мл; V_4 – об'єм супернатанту, мл; 11,4 - коефіцієнт мікромолярної абсорбції ТНФА при 412 нм; C – концентрація протеїну, мг/мл; t – час інкубування з реактивом Елмана, хв.

Для виявлення протеїнів глутатіонпероксидази проводили електрофорез у 7,5 % ПААГ: зразки культури клітин розбавляли 1:1 Трис-гліциновим буфером та додавали 0,05 мл 40% сахарози. У лунки концентруючого гелю вносили 0,02 мл проби (кінцева концентрація протеїну 100 мкг). Для виявлення протеїнів глутатіонпероксидази пластини гелю інкубували у суміші з 50 мМ Трис-HCl буфері (рН7,9), 3 мМ відновленого глутатіону, 0,004% H₂O₂, 1,2 мМ

НСТ і 1,6 мМ ФМС протягом 45 хв. Незафарбовані смуги ензиму проявлялися на фіолетово-синьому фоні [267]. Ізозими ензимів антиоксидантного захисту ідентифікували за С. J. Weydert, et al. [268].

2.2.4. Визначення концентрації статевих гормонів у культурі клітин гранульози. Для виявлення інтенсивності синтезу статевих гормонів клітинами гранульози у середовищі культивування визначали концентрацію прогестерону, естрадіолу і тестостерону (нМоль/л) впродовж культивування (7, 14, 21 і більше діб; 38 - 40 діб) імуноензимним методом з використанням аналізатора Stat Fax 3000 та наборів реактивів фірми "DRG" відповідно до інструкції використання тест-систем.

Зокрема, для дослідження прогестерону вносили по 25 мкл проби, інкубували при 20 - 22°C 5 хв., додавали 200 мкл імуноензимного кон'югату, перемішували та знову інкубували 60 хв. Лунки звільняли від вмістимого, тричі промивали відмиваючим розчином, вносили 200 мкл ензим-субстрату та інкубували 15 хв. Зупиняли реакцію додаванням 100 мкл стоп-розчину.

Для встановлення концентрації естрадіолу в лунки вносили 25 мкл проби і 200 мкл ензимного кон'югату, перемішували й інкубували 120 хв. при 20 - 22°C. Лунки звільняли від вмістимого, тричі промивали відмиваючим розчином, вносили 100 мкл ензим-субстрату та інкубували 15 хв. Зупиняли реакцію додаванням 50 мкл стоп-розчину.

Для дослідження тестостерону вносили по 25 мкл проби, додавали 200 мкл імуноензимного кон'югату, перемішували та інкубували 60 хв при 20 - 22°C. Лунки звільняли від вмістимого, тричі промивали відмиваючим розчином, вносили 200 мкл ензим-субстрату та інкубували 15 хв. Зупиняли реакцію додаванням 100 мкл стоп-розчину. Екстинцію зразків вимірювали при $\lambda = 450$ нм. Одночасно зі зразками гранульози досліджували стандартні розчини з відомою концентрацією гормонів.

2.2.5. Дослідження впливу окремих факторів на інтенсивність окисних процесів і синтез гормонів клітинами гранульози. При вивченні впливу окремих факторів на інтенсивність окисних процесів і синтез гормонів

культурою клітин досліджували біохімічні показники гранульози залежно від складу середовищ, тривалості культивування та додавання субстратів.

При вивченні впливу складу середовищ культивування на інтенсивність окисних процесів у клітинах використані середовища - Dulbeccos modified Eagle medium (DME), Basal Medium Eagle (BME) і RPMI-1640 з додаванням (в мас. %): еструсної сироватки корів (8 – 12 %), фолікулярної рідини (10 – 12 %), гепарину (0,001 од/100мл), інсуліну (4 мкг/мл).

Отриману суспензію клітин гранульози ділили на три частини, вносили у планшети (діаметр лунок 3 см) і культивували у вищевказаних середовищах протягом 38-40 діб у герметично закритому ексікаторі при 100 % вологості, температурі 38,5°C і присутності в атмосфері 5 % CO₂. Через кожні 7 діб проводили заміну 2/3 середовища і вивчали: інтенсивність поглинання кисню клітинами та відновну здатність без - та з додаванням позаклітинного акцептора електронів (K₃[Fe(CN)₆]; K₃...; 10⁻⁴M) і концентрації гормонів (тестостерону, прогестерону і естрадіолу).

Для встановлення впливу субстратів на інтенсивність окисних процесів, активність ензимів антиоксидантного і енергетичного обміну клітини гранульози суспендували у вище наведених середовищах культивування клітин з аналогічним вмістом доданих компонентів. Склад середовищ культивування балансували за: RPMI-1640 - сукцинатом (100 мг/л) і BME – за відновленою формою глутатіону (1,0 мг/л). До збалансованого складу обох середовищ культивування додатково додавали натрію піруват в дозах - 17, 35, 52 мг/л. Преінкубовану культуру клітин (4 - 5 діб в BME) ділили на частини: контрольну – без та дослідні - з додаванням натрію пірувату. Підраховували кількість клітин в камері Горяєва впродовж культивування (тис / мл). Ефективність культивування визначали за концентрацією гормонів (естрадіолу, прогестерону і тестостерону; імуноферментним методом; нмоль / л середовища культивування клітин) і активністю ензимів у культурі клітин: СОД, КАТ, ГПО, МДГ і ЛДГ.

З метою встановлення впливу окисних процесів на здатність гранульози зберігати синтез гормонів провели 3 пасажі культури гранульози з культивуванням кожного з них впродовж 14 діб у RPMI-1640 та дослідженням активності СОД, КАТ, ГПО і концентрації стероїдних гормонів.

2.2.6. Апробування ефективності ветеринарного препарату на основі середовища культивування клітин гранульози. 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 методом варіаційної статистики з використанням t-критерію Стьюдента і η – кореляційного відношення за М. О. Плохінським [269] та з застосуванням персонального комп'ютера й програмного забезпечення Clipper. Різницю між середніми арифметичними значеннями вважали статистично вірогідною: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Дихальна активність та відновна здатність клітин гранульози

Інтенсивність дихання клітин та нагромадження відновних еквівалентів у позаклітинному середовищі – показники, які характеризують напруженість окисно-відновних процесів зв'язаних як з ресинтезом АТФ, так і окисним перетворенням мембранних структур, цитозольних компартментів і мітохондрій [270, 271]. Водночас доведено, що підвищення рівня Оксигену за культивування фолікулів та клітин мишей і корів покращує їх розвиток, диференціювання та дозрівання ооцитів [272, 273, 274], що зв'язано з ефективністю ресинтезу АТФ. Тому, досліджували дихальну активність та відновну здатність клітин гранульозного шару за культивування у зв'язку з розміром фолікулів і фізіологічним станом яєчників корів, з яких вони вилучені.

Дихальна активність клітин гранульози становить $5,9 \pm 0,28$ нг-атом $O/xv \times 0,1$ мл СК, а відновна здатність - $4,3 \pm 0,19$ $K_3.../xv \times 0,1$ мл СК (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Дихальна активність та відновна здатність клітин гранульози, $M \pm m$

Фізіологічний стан яєчника	n	Дихальна активність, нг-атом $O/xv \times 0,1$ мл СК		Відновна здатність, $K_3[Fe(CN)_6]/xv \times 0,1$ мл СК	
		без $K_3...$	з $K_3...$	без $K_3...$	з $K_3...$
«свіжа овуляція»	41	$3,1 \pm 0,42^{***}$	$2,5 \pm 0,42$	$4,1 \pm 0,48$	$2,8 \pm 0,51$
«раннє жовте тіло»	63	$3,9 \pm 0,58^{***}$	$2,9 \pm 0,39$	$4,8 \pm 0,51$	$4,1 \pm 0,44$
«пізнє жовте тіло»	70	$4,8 \pm 0,78^*$	$3,0 \pm 0,44$	$4,6 \pm 0,43$	$4,0 \pm 0,47$
«фолікулярний ріст»	157	$7,0 \pm 0,47$	$2,6 \pm 0,30$	$4,1 \pm 0,31$	$3,7 \pm 0,35$

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

При цьому, у середовищі культивування існує дефіцит акцептора електронів - Оксигену. Так, додавання до культури клітин фериціаніду калію знижує дихальну активність на 54,3 % і відновну здатність на 14,0 %. Одночасно, величини досліджуваних показників у гранульозі, залежать від фізіологічного стану яєчників. Найвищою дихальною активністю характеризуються клітини з фолікулів яєчника «фолікулярного росту» ($7,0 \pm 0,47$ нг-атом О/хв $\times 0,1$ мл СК), меншою на 31,5 % ($p < 0,05$) з «пізнього жовтого тіла» і найнижчою зі «свіжої овуляції» ($3,1 \pm 0,42$ нг-атом О/хв $\times 0,1$ мл СК). Різниця між мінімальною і максимальною величинами становить 55,8 % ($p < 0,001$). Менша відмінність виявлена за відновною здатністю клітин - 4,1 - 4,8 К₃.../хв $\times 0,1$ мл СК, а різниця між величинами значень в межах похибки середнього арифметичного. Інші результати отримані при додаванні акцептора електронів. Дихальна активність гранульози знижувалась і незалежно від фізіологічного стану яєчників становила 2,5 - 3,0 нг-атом О/хв $\times 0,1$ мл СК. На противагу, відновна здатність максимальна у клітин з яєчників «раннього та пізнього жовтого тіла» (4,0 - 4,1 К₃.../хв $\times 0,1$ мл СК, менша на 9,8 % з «фолікулярного росту» і найнижча за «свіжої овуляції» (на 31,8 %; $2,8 \pm 0,51$ К₃.../хв $\times 0,1$ мл СК). Таким чином, дихальна активність і відновна здатність гранульози залежать від фізіологічного стану яєчників, з яких вилучені клітини.

Дихальна активність і відновна здатність клітин гранульози, крім фізіологічного стану статевої залози, залежать ще й від розміру фолікулів з яких вони вилучені. Зокрема, клітини з великого фолікула яєчника «фолікулярного росту» характеризуються максимальною дихальною активністю ($8,0 \pm 0,81$ нг-атом О/хв $\times 0,1$ мл СК), нижчою на 11,3 % з малого (менше 4 мм) і найнижчою ($3,5 \pm 0,83$ нг-атом О/хв $\times 0,1$ мл СК) з середнього (табл. 3.2). Різниця між мінімальною і максимальною величинами показника становить 56,3 % ($p < 0,001$). Зі статевих залоз «пізнього жовтого тіла» і «свіжої овуляції» клітини культивовані з великих та малих фолікулів проявляють майже однакову дихальну активність, відповідно, 4,7 - 5,5 та 3,5 нг-атом О/хв $\times 0,1$ мл СК, а з середніх на 12,8 - 25,5 % і 40,0 % нижчу.

Дихальна активність та відновна здатність клітин гранульози залежно від розміру фолікулів і фізіологічного стану яєчника, $M \pm m$

Фізіологічний стан яєчника	Розмір фолікула, мм	n	Дихальна активність, нг-атом O/хв×0,1 мл СК		Відновна здатність, $K_3[Fe(CN)_6]$ / хв×0,1 мл СК	
			без $K_3...$ /	з $K_3...$ /	без $K_3...$ /	з $K_3...$ /
«свіжа овуляція»	>7	13	3,5±0,69	2,7±0,82	4,4±0,67	2,6±0,71
	4-7	13	2,1±0,34	1,9±0,29	3,3±0,84	2,7±0,93
	4<	15	3,5±0,95	2,8±0,90	4,3±0,89	3,1±0,92
«раннє жовте тіло»	>7	21	4,5±1,29	3,0±0,71	5,2±0,88	3,4±0,79
	4-7	21	3,6±0,91	2,9±0,61	4,8±0,51	4,1±0,44
	4<	21	3,8±0,91	3,0±0,82	4,1±0,74	4,2±0,77
«пізнє жовте тіло»	>7	27	4,7±1,67	2,8±0,87	5,0±0,72	3,3±0,83
	4-7	20	4,1±1,10	3,3±0,91	4,8±0,72	4,8±0,87
	4<	23	5,5±1,38	3,0±0,65	3,9±0,88	3,9±0,79
«фолікулярний ріст»	>7	83	8,0±0,81	2,8±0,63	3,9±0,51	4,0±0,72
	4-7	32	3,5±0,83***	1,9±0,46	4,4±0,64	3,1±0,70
	4<	42	7,1±0,68	2,7±0,45	4,2±0,48	3,8±0,52

Культура гранульози з малого і середнього фолікулів яєчників «раннього жовтого тіла» споживає однакову кількість кисню (3,6 - 3,8 нг-атом O/хв×0,1 мл СК) і на 25,0 % більшу з великого.

Дослідження відновної здатності гранульози залежно від розміру фолікула і фізіологічного стану яєчника свідчать, що за «фолікулярного росту» величина значення майже однакова - 3,9 - 4,4 $K_3...$ /хв×0,1 мл СК, різниця становить 0,5 $K_3...$ /хв×0,1 мл СК, що в межах похибки середнього арифметичного. За «раннього і пізнього жовтого тіла» відновна здатність гранульози з малого фолікула, відповідно, 4,1±0,74 і 3,9±0,88 $K_3...$ /хв×0,1 мл СК, вища на 17,0 - 23,0 % з середнього і найвища (5,2±0,88 і 5,0±0,72 $K_3...$ /хв×0,1 мл СК) з великого. За фізіологічного стану яєчника «свіжої овуляції»

низькою величиною показника ($3,3 \pm 0,84 \text{ K}_3 \dots / \text{хв} \times 0,1 \text{ мл СК}$) характеризуються клітини з середнього фолікула і вищою на 30,3 - 33,3 % з малого і великого.

Додавання акцептора електронів однозначно зумовлює тенденцію до зниження дихальної активності клітин гранульози не залежно від розмірів фолікулів. Найбільше зниження дихальної активності (в 2,6 - 2,8 разів) виявлено у клітинах з малого і великого фолікулів яєчника «фолікулярного росту», менше (на 40,5 - 45,5 %) з аналогічних діаметрів «пізнього жовтого тіла», ще менше (19,5 - 22,9 %) з середнього фолікула «пізнього жовтого тіла», малого і середнього - «раннього жовтого тіла» та малого і великого «свіжої овуляції». Мінімальне зниження дихальної активності (на 9,6 %) встановлено у гранульозі з середнього фолікула яєчника «свіжої овуляції».

Відновна здатність гранульози за додавання акцептора електронів також змінюється. При цьому, в клітинах з середнього за розміром фолікула яєчника «фолікулярного росту» позаклітинний транспорт електронів знижується на 29,6 %. Аналогічно, зменшення величини показника на 34,0 % виявлено в гранульозі з великого фолікула «пізнього жовтого тіла», на 14,6 і 34,7 %, відповідно, з середнього і великого фолікулів «раннього жовтого тіла» і на 28,0 і 41,0 % - малого та великого «свіжої овуляції». У клітин з інших фолікулів відновна здатність на фоні доданого $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ не змінюється.

Отже, дихальна активність і відновна здатність характеризують особливості окисних процесів у клітинах гранульози за культивування та залежать від стадії розвитку фолікулів яєчників. Найвища дихальна активність проявляється за культивування клітин з домінуючого фолікула статевої залози фізіологічного стану «фолікулярного росту». При цьому, у вказаному фолікулі клітини обмежені в акцепторах електронів у позаклітинному середовищі, а існуючий їх дефіцит компенсується високою інтенсивністю споживання кисню. Подібна залежність проявляється й у культурі клітин з малого фолікула яєчника «фолікулярного росту».

Результати досліджень підрозділу опубліковані в 5 статтях [275, 276, 277, 278, 279].

3.2. Активність і вміст ізозимів лактатдегідрогенази та малатдегідрогенази клітин гранульозного шару фолікулів корів

Відомо, що клітини фолікулів яєчників корів (гранульози і ооцит-кумуляні комплекси) здатні засвоювати глюкозу з середовищ як природних (фолікулярної рідини), так і культивування [280, 281]. Гранульоза перетворює глюкозу гліколізом в лактат і піруват, а останній надходить в ооцити, для ресинтезу АТФ [282, 283, 284, 285]. Тому, вивчали активність і вміст ізоформ лактатдегідрогенази.

При середній активності ЛДГ - $1,9 \pm 0,27$ мкмоль /хв×мг протеїну у культурі гранульози, вища величина значення у клітин з фолікулів яєчників «раннього жовтого тіла» ($2,1 \pm 0,19$ мкмоль /хв×мг протеїну), менша на 4,8 % з «фолікулярного росту» і «свіжої овуляції» і ще нижча (на 9,4 %) з «пізнього жовтого тіла» (табл. 3.3). При цьому, активність ензиму проявляє коливання

Таблиця 3.3

Активність лактатдегідрогенази в клітинах гранульози, $M \pm m$

Фізіологічний стан яєчника	Розмір, мм	n	Активність, мкмоль /хв×мг протеїну
«свіжа овуляція»	>7	3	$1,7 \pm 0,31^*$
	4-7	3	$2,1 \pm 0,43$
	4<	3	$2,1 \pm 0,18$
«раннє жовте тіло»	>7	3	$2,1 \pm 0,14$
	4-7	3	$2,7 \pm 0,10$
	4<	3	$1,4 \pm 0,11^{***}$
«пізнє жовте тіло»	>7	3	$2,1 \pm 0,15$
	4-7	3	$2,4 \pm 0,07$
	4<	3	$1,4 \pm 0,33^*$
«фолікулярний ріст»	>7	21	$2,1 \pm 0,44$
	4-7	15	$1,5 \pm 0,22^{***}$
	4<	15	$2,3 \pm 0,40$

величин значень, які зумовлені розміром фолікула з яких вилучені клітини. Зокрема, найнижча активність ензиму виявлена у гранульозі з малих фолікулів «раннього» і «пізнього жовтого тіла» ($1,4 \text{ мкмоль /хв} \times \text{мг протеїну}$), на $33,3 \%$ вища у фолікулах до 7 мм яєчника «свіжої овуляції» і більше 7 мм - «фолікулярного росту» та «пізнього жовтого тіла», а максимальна ($2,7 \pm 0,10 \text{ мкмоль /хв} \times \text{мг протеїну}$) з середнього «раннього жовтого тіла».

Активність ЛДГ забезпечують ізозими, які відрізняються за рухливістю в електричному полі і поділяються на 5 основних каталітично активних протеїни ЛДГ1, ЛДГ2, ЛДГ3, ЛДГ4 і ЛДГ5 (рис. 3.1). Встановлено, що

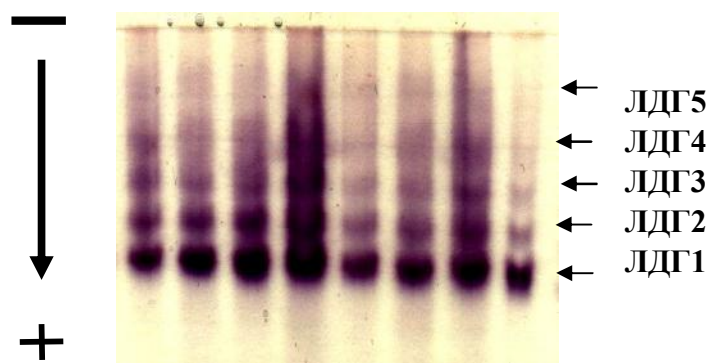


Рис. 3.1. Ізозими лактатдегідрогенази культури клітин гранульози

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. Зокрема, високий вміст ЛДГ5 ($21,1 \pm 1,83 \%$) характерний для культури гранульози зі статевої залози «свіжої овуляції» і нижчий на $1,8 - 3,8 \%$ для клітин з фолікулів інших фізіологічних станів яєчника (табл. 3.4). Аналогічно, ЛДГ4 найбільше у культурі клітин зі статевої залози «свіжої овуляції» ($22,9 \pm 2,45 \%$), менше на $4,2 - 5,8 \%$ 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 $7,0 \%$. Для культури гранульози з яєчника «раннього жовтого тіла» характерний високий вміст ЛДГ3 ($25,4 \pm 3,32 \%$), на $5,4 \%$ менший з

Вміст ізозимів лактатдегідрогенази в 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	9	21,1±1,83	11	17,9±3,14	14	19,3±3,44	96	17,3±0,94
ЛДГ 4	9	22,9±2,45	11	17,1±2,93	14	15,9±2,35	96	18,7±0,98
ЛДГ 3	9	17,6±1,83	11	25,4±3,32	14	20,0±2,72	96	20,0±0,95
ЛДГ 2	9	17,1±1,50	11	16,5±2,00	14	18,2±0,25	96	19,0±0,90
ЛДГ 1	9	21,2±1,49	11	23,4±2,62	11	26,9±3,59	14	25,1±1,44

«пізнього жовтого тіла» і «фолікулярного росту», а найменший (17,6±1,83 %) зі «свіжої овуляції». Вміст ЛДГ2 у гранульозі, не залежно 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 в інкубованих клітинах з фолікулів яєчників «пізнього жовтого тіла», менший на 1,8 – 3,5 % проявляється за «фолікулярного росту» і «раннього жовтого тіла», а найнижчий (21,2±1,49 %) зі статевої залози «свіжої овуляції».

Аналіз вмісту ізозимів свідчить, що клітини гранульози з яєчників «пізнього жовтого тіла» і «фолікулярного росту», перетворюють лактат в піруват зі стимулюванням активності ЦТК та мітохондріального дихання (ЛДГ1+ЛДГ2 – 44,1 - 45,1 % проти ЛДГ4+ЛДГ5 – 35,2 – 36,0 %; рис. 3.2).

І навпаки, у гранульозі з яєчника «свіжої овуляції» переважає нагромадження лактату, над використанням цукрів аеробним шляхом (ЛДГ4+ЛДГ5 - 44,0 % проти ЛДГ1+ЛДГ2 – 38,0 %).

Поряд з особливостями використання цукрів клітинами гранульози, залежно від фізіологічного стану яєчника, існують різниці в метаболізмі клітин при оцінюванні ізозимів ЛДГ ще й у зв'язку з розміром фолікула. Так, високий

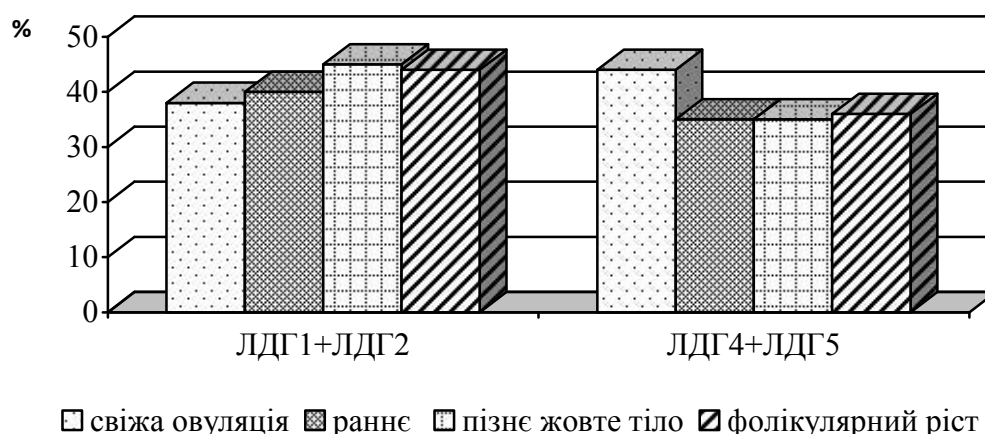


Рис. 3.2. Вміст ізозимів лактатдегідрогенази аеробного (ЛДГ1+ЛДГ2) і анаеробного (ЛДГ4+ЛДГ5) метаболізму клітин гранульози

вміст ЛДГ1 в культурі з малого фолікула яєчника «пізнього жовтого тіла» ($36,3 \pm 6,68$ %), менший на 6,6 % з аналогічних за розміром «раннього жовтого тіла» і на 10,4 - 14,6 % «фолікулярного росту» і «свіжої овуляції» (табл. 3.5).

Таблиця 3.5

Вміст ізозимів ЛДГ в культурі клітин залежно від розміру фолікула з яких отримана гранульоза, $M \pm m$

Стан яєчника	мм	Порядковий номер та вміст ізозимів ЛДГ, %					
		n	ЛДГ 1	ЛДГ 2	ЛДГ 3	ЛДГ 4	ЛДГ 5
«свіжа овуляція»	>7	3	$17,0 \pm 1,63^*$	$13,7 \pm 1,50$	$13,3 \pm 2,76^*$	$29,7 \pm 2,13$	$26,3 \pm 1,52$
	4-7	3	$25,0 \pm 2,16$	$18,7 \pm 3,30$	$16,0 \pm 1,70$	$25,0 \pm 2,36$	$15,3 \pm 2,37$
	4<	3	$21,7 \pm 1,36$	$19,0 \pm 0,80$	$23,3 \pm 1,36$	$14,0 \pm 0,82$	$21,7 \pm 1,36$
«раннє жовте тіло»	>7	4	$16,3 \pm 2,04^*$	$17,3 \pm 3,80$	$31,0 \pm 5,06$	$14,5 \pm 3,72$	$21,0 \pm 5,16$
	4-7	4	$24,8 \pm 3,81$	$18,0 \pm 2,70$	$18,8 \pm 2,68$	$18,5 \pm 4,04$	$20,3 \pm 4,29$
	4<	3	$31,0 \pm 0,47$	$13,3 \pm 1,20$	$27,0 \pm 5,44$	$18,7 \pm 6,08$	$10,7 \pm 2,33^{**}$
«пізнє жовте тіло»	>7	5	$18,4 \pm 4,22$	$20,8 \pm 3,70$	$23,2 \pm 6,06$	$13,4 \pm 1,66^{**}$	$24,4 \pm 7,76$
	4-7	5	$27,8 \pm 3,47$	$19,8 \pm 4,00$	$15,4 \pm 0,61^*$	$21,2 \pm 4,19$	$16,2 \pm 2,89$
	4<	4	$36,3 \pm 6,68$	$13,0 \pm 2,70$	$21,8 \pm 3,11$	$12,5 \pm 3,63^*$	$16,8 \pm 2,30$
«фолікулярний ріст»	>7	45	$26,6 \pm 2,51$	$19,8 \pm 1,40$	$20,0 \pm 1,32$	$18,6 \pm 1,38$	$14,9 \pm 0,93$
	4-7	30	$22,6 \pm 2,31$	$17,6 \pm 1,80$	$17,6 \pm 1,48^*$	$21,3 \pm 2,05$	$21,0 \pm 2,35$
	4<	21	$25,2 \pm 2,14$	$19,3 \pm 1,90$	$23,5 \pm 2,47$	$14,9 \pm 1,46$	$17,1 \pm 1,57$

Найнижчий вміст вказаного ізозиму проявлявся у клітин з великих фолікулів «раннього жовтого тіла» і «свіжої овуляції» (15,0 - 17,0 %; $p < 0,05$). Вміст ЛДГ2 у гранульозі з малих фолікулів статевої залози «пізнього» та «раннього жовтого тіла» і великих «свіжої овуляції» в межах 13,0 - 13,7 % і вищий на 4,3 - 7,5 % з фолікулів іншого діаметру, різниця між величинами значень знаходиться в межах похибки середнього арифметичного ($p > 0,05$). У клітинах з великого фолікула яєчника «раннього жовтого тіла» вміст ЛДГ3 високий ($31,0 \pm 5,06$ %), менший на 12,2 - 18,0 % з середніх, без виключення, фолікулів всіх фізіологічних станів статевої залози, а найменший (17,7 %; $p < 0,05$) з великого фолікула «свіжої овуляції». Для клітин з фолікула більше 7 мм яєчника «свіжої овуляції» характерний найвищий вміст ЛДГ4 ($29,7 \pm 2,13$ %), нижчий на 4,7 - 11,2 % з середніх «свіжої овуляції», «пізнього жовтого тіла» і «фолікулярного росту». Понижений вміст (12,5 - 13,4 %) виявлений у гранульозі малих і великих фолікулів «пізнього жовтого тіла».

Вміст ЛДГ5 високий у клітинах з великих фолікулів яєчників «свіжої овуляції», «раннього» і «пізнього жовтого тіла» (21,0 - 26,3 %), менший на 4,2 - 19,2 % з малих - «фолікулярного росту» і «пізнього жовтого тіла», а найнижчий ($10,7 \pm 2,33$ %; $p < 0,01$) у гранульозі малих фолікулів «раннього жовтого тіла».

Вивченням активності МДГ встановлено, що величина значення показника у клітинах гранульози становить $1,1 \pm 0,05$ мкмоль / хв×мг протеїну. При цьому, у клітин з яєчників фізіологічних станів «фолікулярного росту» та «пізнього жовтого тіла» активність ензиму майже однакова (1,0 - 1,1 мкмоль / хв×мг протеїну), на 21,4 % ($p < 0,01$) вища з «раннього жовтого тіла» і найвища ($1,9 \pm 0,20$ мкмоль / хв×мг протеїну) зі «свіжої овуляції». Різниця між мінімальними і максимальними величинами значень становить 47,4 % ($p < 0,001$).

Активність МДГ гранульози залежить від розміру фолікула з яких вилучені клітини для культивування. Максимальна активність ($2,5 \pm 0,24$ мкмоль / хв×мг протеїну) у клітин малого фолікула яєчника «свіжої овуляції», нижча на 24,0 - 36,0 % ($p < 0,05$) з середніх фолікулів «свіжої овуляції» і «раннього

жовтого тіла», а з інших за розміром фолікулів та фізіологічних станів яєчників ще менша на 48,0 - 60,0 % ($p < 0,01 - 0,001$; табл. 3.6).

Таблиця 3.6

Активність малатдегідрогенази в клітинах гранульози, $M \pm m$

Фізіологічний стан яєчника	Розмір, мм	n	Активність, мкмоль/хв×мг протеїну
«свіжа овуляція»	>7	3	1,3±0,12 ^{**}
	4-7	3	1,9±0,19
	4<	3	2,5±0,24
«раннє жовте тіло»	>7	3	1,3±0,14 ^{**}
	4-7	4	1,6±0,10 [*]
	4<	3	1,3±0,12 ^{**}
«пізнє жовте тіло»	>7	5	1,1±0,09 ^{***}
	4-7	4	1,2±0,13 ^{**}
	4<	6	1,1±0,05 ^{***}
«фолікулярний ріст»	>7	31	1,1±0,18 ^{***}
	4-7	25	1,1±0,16 ^{***}
	4<	72	1,0±0,09 ^{***}

Таким чином, клітини з яєчників фізіологічних станів «фолікулярного росту» і «пізнього жовтого тіла», не залежно від розміру фолікулів, характеризуються пониженою активністю МДГ. У гранульози з фолікулів до 7 мм зі статевої залози «свіжої овуляції» за культивування активність ензиму підвищена.

Електрофорезом в 7,5 % ПААГ виявлено 5 ізозимів МДГ, які характеризуються різною рухливістю в електричному полі, а активні смуги протеїнів ензиму на фореграмах проявляються не однаковою площею та інтенсивністю зафарбування (рис. 3.3). Крім того, у окремих зразках культури клітин гранульози проявляються не всі ізозими.

Встановлено, що вміст ізозимів у культурі гранульози залежить від фізіологічного стану яєчників корів. Так, низьким вмістом МДГ1 ($5,9 \pm 1,31$ %) та МДГ5 ($13,8 \pm 2,00$ %) характеризуються клітини з фолікула яєчника

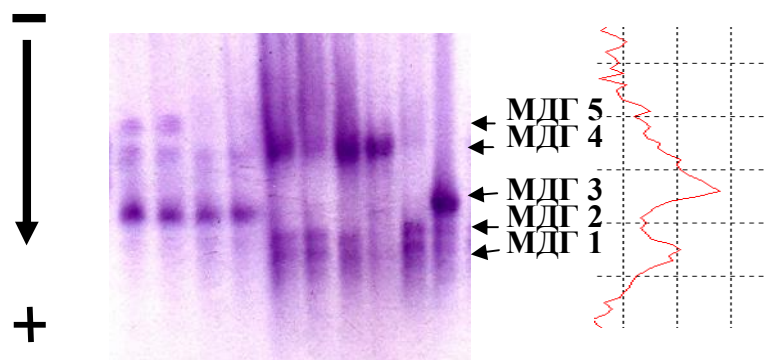


Рис. 3.3. Ізозими малатдегідрогенази клітин гранульози

фізіологічного стану «свіжої овуляції», а найвищими (відповідно, $16,3 \pm 1,44$ і $30,2 \pm 2,37$ %) - з «фолікулярного росту» (табл. 3.7). Різниця між максимальними

Таблиця 3.7

Вміст ізозимів МДГ в культурі клітин залежно від фізіологічного стану яєчника, %; $M \pm m$

Ізозими	Фізіологічний стан яєчника			
	«свіжа овуляція», n = 9	«раннє жовте тіло», n = 10	«пізнє жовте тіло», n = 21	«фолікулярний ріст», n = 135
МДГ 5	$13,8 \pm 2,00^{***}$	$20,4 \pm 2,66^*$	$25,2 \pm 4,81$	$30,2 \pm 2,37$
МДГ 4	$28,9 \pm 3,60$	$20,1 \pm 3,99$	$15,9 \pm 2,86^*$	$14,7 \pm 0,99^{***}$
МДГ 3	$35,6 \pm 4,70$	$24,4 \pm 4,44^*$	$41,2 \pm 5,88$	$20,1 \pm 1,96^{**}$
МДГ 2	$15,8 \pm 2,90$	$20,2 \pm 6,39$	$9,6 \pm 2,19$	$18,7 \pm 1,45$
МДГ 1	$5,9 \pm 1,31$	$14,9 \pm 2,05$	$8,1 \pm 1,92^{***}$	$16,3 \pm 1,44$

і мінімальними величинами значень становить $10,4 - 16,4$ % ($p < 0,001$). Вміст МДГ2 у культурі клітин з яєчників зі «свіжої овуляції», «раннього жовтого тіла» і «фолікулярного росту» майже однаковий ($15,8 - 20,2$ %) і нижчий на $6,2 - 10,6$ % з «пізнього жовтого тіла». Для клітин з фолікулів яєчника «пізнього жовтого тіла» характерний високий вміст МДГ3 ($41,2 \pm 5,88$ %), що вище на

5,6 % порівняно з гранульозою зі «свіжої овуляції» і на 16,8 - 21,1 % ($p < 0,05 - 0,01$) з «раннім жовтим тілом» і «фолікулярним ростом». Вміст МДГ4 у культурі з яєчника «свіжої овуляції» максимальний ($28,9 \pm 3,60$ %), нижчий на 8,8 % з «раннього жовтого тіла» і ще нижчий на 13,0 - 14,2 % ($p < 0,05 - 0,001$) за «пізнього жовтого тіла» і «фолікулярного росту». Таким чином, вміст ізозимів МДГ в культурі клітин залежить від фізіологічного стану яєчника.

Крім того виявлено відмінності вмісту ізозимів МДГ при дослідженні культури отриманої з різних за діаметром фолікулів і фізіологічного стану статевих залоз. Зокрема, найвищим вмістом МДГ1 характеризуються клітини отримані з фолікулів більше 7 мм яєчників «свіжої овуляції» та «фолікулярного росту» (18,5 - 19,4 %) і 4 – 7 мм «раннього жовтого тіла» ($19,3 \pm 4,13$ %; табл. 3.8). Низькі величини значень вказаного ізозиму виявлені у клітин з фолікулів

Таблиця 3.8

Вміст ізозимів МДГ в культурі клітин залежно від розміру фолікула з яких вилучені клітини, %; $M \pm m$

Яєчник	мм	n	Вміст ізозимів				
			МДГ 1	МДГ 2	МДГ 3	МДГ 4	МДГ 5
«свіжа овуляція»	>7	3	18,5±1,96	8,3±0,98	43,0±9,80	20,2±0,72	10,0±1,70
	4-7	3	7,3±1,91***	23,7±4,35	35,0±6,98	20,3±2,42	13,7±5,21
	4<	3	9,0±2,70	20,5±6,01	32,0±5,66	23,5±13,79	15,0±1,41
«раннє жовте тіло»	>7	3	12,0±0,82	18,3±4,71	23,0±6,35	26,3±4,20	20,4±2,06
	4-7	4	19,3±4,13	9,0±3,59	30,8±6,22	20,4±8,02	20,5±4,13
	4<	3	15,3±2,37	26,0±5,12	21,7±7,64	12,0±1,41*	25,0±9,19
«пізнє жовте тіло»	>7	11	5,7±1,76	7,2±2,24	45,1±8,79	14,0±2,71*	28,1±7,74
	4-7	5	6,6±2,49	14,0±4,97	40,2±10,51	23,0±8,79	16,2±3,68
	4<	5	15,0±5,28	12,6±6,27	32,2±8,55	16,0±4,31	24,2±6,74
«фолікулярний ріст»	>7	40	19,4±3,12	16,9±2,48	21,8±3,48	13,4±1,64	28,5±4,77
	4-7	30	14,2±2,38	19,5±3,47	28,1±4,50	16,7±2,55	21,6±3,98
	4<	65	13,5±2,04	20,1±2,11	25,5±2,81	14,1±1,41	26,8±3,36

більше 4 мм статевої залози «пізнього жовтого тіла» (5,7 - 6,6 %) та менше 7 мм «свіжої овуляції» (7,3 - 9,0 %). Різниця між мінімальними і максимальними значеннями становить 13,7 % ($p < 0,001$). Подібні відмінності виявлені при дослідженні МДГ2: максимальне значення ($26,0 \pm 5,12$ %) встановлено у культурі з фолікула менше 4 мм яєчника «раннього жовтого тіла», а найнижчі (7,2 і 8,3 %) з фолікулів більше 7 мм «свіжої овуляції» і «пізнього жовтого тіла». У клітин, які отримані з інших за розміром фолікулів та фізіологічних станів статевої залози вміст іозиму знаходиться в межах 12,6 - 23,7 %, різниця між вказаними значеннями в межах похибки середнього арифметичного ($p > 0,05$). Дослідження МДГ3 свідчать про максимально високий вміст іозиму в гранульозі з фолікулів більше 7 мм яєчників «пізнього жовтого тіла» ($45,1 \pm 8,79$ %), майже такий ж (40,2 - 43,0 %) з великого «свіжої овуляції» і середнього «пізнього жовтого тіла» та понижений вміст (21,7 - 25,5 %) у клітин з великих та малих фолікулів статевих залоз «фолікулярного росту» і «раннього жовтого тіла». Вміст МДГ4 найвищий ($26,3 \pm 4,20$ %) у клітинах з великих фолікулів яєчників «раннього жовтого тіла» і на 12,0 - 14,3 % ($p < 0,05$) нижчий з малого і великого - «фолікулярного росту», з великого - «пізнього» і малого - «раннього жовтого тіла». Дослідження МДГ5 виявило, що найвищим вмістом ($28,5 \pm 4,77$ %) іозиму характеризуються клітини з фолікулів більше 7 мм яєчника «фолікулярного росту», нижчі на 1,7 - 4,3 % з менше 4 мм «фолікулярного росту» і «пізнього жовтого тіла» (24,2 - 26,8 %), а найнижчі (10,0 - 15,0 %), незалежно від розмірів, «свіжої овуляції». У клітин з фолікулів яєчника «раннього жовтого тіла» вміст МДГ5 нижчий на 3,5 - 8,1 %, порівняно з максимальною величиною і знаходиться в межах 20,4 - 25,0 %.

Таким чином, вміст іозимів МДГ залежно від розміру фолікула і з урахуванням фізіологічного стану яєчника характеризує особливості метаболізму клітин гранульози за культивування. Для клітин з великого фолікула яєчника «пізнього жовтого тіла» характерне постачання малату з цитозолу в мітохондрії та, одночасно, інтенсивне його включення в ЦТК.

Результати досліджень підрозділу опубліковані у 2 статтях [286, 287].

3.3. Активність і вміст ізозимів ензимів антиоксидантного захисту за культивування клітин гранульози

Активність ензиматичної ланки АОЗ у фолікулах яєчників самок знищує цитотоксичні продукти Оксигену, забезпечує збереженість генетичного матеріалу й існування ооцит-кумулясних комплексів, значною мірою визначає здатність до запліднення статевих клітин і розвитку ембріонів [288, 289, 290, 291, 292, 293]. При цьому, рівень утворення та інтенсивність знищення АФО визначається рядом факторів *in vivo*: дією гонадотропних гормонів, впливом різноманітних ендо- і екзогенних чинників, що своєю чергою, впливає на здатність клітин виживати за культивування [294, 295, 296]. Тому, вивчали активність ензиматичної ланки антиоксидантного захисту клітин гранульози за культивування в зв'язку з фізіологічним станом статевої залози і розміром фолікулів.

Клітини гранульози за культивування проявляють активність ензимів АОЗ: СОД - $12,4 \pm 0,74$ МО/ мг протеїну, ГПО і КАТ, відповідно, $0,61 \pm 0,06$ та $0,39 \pm 0,02$ мкмоль/хв×мг протеїну (табл. 3.9). Активність ензимів антиоксидантного захисту за культивування гранульози залежать від фізіологічного стану яєчників з яких вона отримана. Висока активність СОД проявляється у клітин з статевих залоз «свіжої овуляції» та «пізнього жовтого тіла» ($17,0 - 18,2$ МО/ мг протеїну), нижча на $31,8 - 36,3$ % з «фолікулярного росту» і найменша ($8,1 \pm 1,41$ МО/ мг протеїну) з «раннього жовтого тіла». Різниця між максимальною і мінімальною величинами значень показника – $55,5$ % ($p < 0,01$).

Таким чином, для гранульози з фолікулів яєчника «фолікулярного росту», характерна стабільна активність СОД. У клітин з фолікулів яєчників «свіжої овуляції» і «пізнього жовтого тіла» проявляється тенденційно вища активність ензиму, що може вказувати на активування окисних процесів й інтенсивніше утворення $O_2^{\bullet -}$ за культивування. Клітини гранульози яєчника «раннього

**Активність ензимів антиоксидантної системи за інкубування клітин
гранульози, $M \pm m$**

Фізіологічний стан яєчника	Фолікул, мм	n	Активність ензимів		
			СОД, МО/мг протеїну	ГПО, мкмоль/хв×мг протеїну	КАТ, мкмоль/хв×мг протеїну
«свіжа овуляція»	> 7	3	17,8±5,48	0,24±0,05	0,56±0,15
	4 - 7	3	17,0±4,95	0,25±0,07	0,54±0,16
	4 <	3	19,8±3,75	0,27±0,04	0,57±0,18
«раннє жовте тіло»	> 7	5	9,3±3,18	1,14±0,02	0,33±0,04
	4 - 7	3	6,8±1,72**	0,09±0,02***	0,28±0,04
	4 <	3	8,2±1,96	0,08±0,01***	0,40±0,05
«пізнє жовте тіло»	> 7	9	18,9±3,99	0,80±0,22	0,53±0,09
	4 - 7	6	17,5±4,99	0,83±0,37	0,55±0,10
	4 <	7	14,1±3,47	1,01±0,37	0,51±0,08
«фолікулярний ріст»	> 7	33	12,2±1,47	0,72±0,12	0,50±0,06
	4 - 7	29	11,1±1,38	0,57±0,09	0,30±0,04**
	4 <	31	11,4±1,24	0,61±0,12	0,31±0,04**

жовтого тіла» характеризуються найнижчою активністю СОД, що свідчить про потенційне нагромадження $O_2^{\cdot-}$ і, як наслідок, порушення обмінних процесів та їх уразливість при культивуванні.

Подібну залежність виявлено при дослідженні ензимів, які перетворюють H_2O_2 . Активність ГПО низька за «раннього жовтого тіла» (0,09±0,01 мкмоль/хв×мг протеїну), на 64,0 % вища при «свіжій овуляції» і ще на 86,0 - 89,7 % ($p < 0,001$) більша при «фолікулярному рісті» та «пізньому жовтому тілі». Аналогічно, активність КАТ понижена за «раннього жовтого тіла» і «фолікулярного росту» (0,34 - 0,36 мкмоль/хв×мг протеїну) та вища за «свіжої овуляції» і «пізнього жовтого тіла» (0,53 - 0,56 мкмоль/хв×мг протеїну).

Отже, низька активність ензимів антиоксидантного захисту в культурі гранульози з фолікулів яєчника «раннього жовтого тіла» свідчить про понижену здатність клітин перетворювати $O_2^{\cdot-}$ до H_2O_2 і кінцевого продукту - води, зростання продуктів перекисного окиснення ліпідів й активування вільнорадикального окиснення, руйнування структурних компонентів, зниження метаболічної активності за культивування та виживання клітин.

Активність ензимів антиоксидантного захисту культури гранульози залежить не тільки від фізіологічного стану яєчника, але й від розміру фолікулів з яких вона вилучена. Зокрема, за культивування активність СОД низька ($6,8 \pm 1,72$ МО/мг протеїну) у клітин з фолікулів 4 -7 мм яєчника «раннього жовтого тіла», вища на 20,5 % з малого і найвища ($9,3 \pm 3,18$ МО/мг протеїну) з великого. Іншу залежність встановлено при дослідженні культури клітин з фолікулів статевої залози «свіжої овуляції». Висока активність СОД характерна для гранульози з фолікулів менше 4 мм ($19,8 \pm 3,75$ МО/мг протеїну) і на 10,2 – 14,2 % нижча з більше 4 мм. У культурі гранульози з «пізнього жовтого тіла» активність ензиму поступово зростає зі збільшенням розміру фолікула: низька ($14,1 \pm 3,47$ МО/мг протеїну) з малого, вища на 19,5 % з середнього і найвища ($18,9 \pm 3,99$ МО/мг білка) з більше 7 мм. Активність СОД культури гранульози з яєчника «фолікулярного росту» не залежить від величини фолікулів з яких вони вилучені – значення в межах 11,1 – 12,2 МО/мг білка.

Активність ГПО в культурі клітин з фолікулів менше 7 мм яєчника «раннього жовтого тіла» найнижча (0,08 - 0,09 мкмоль/ хв×мг протеїну) і на 93,0 - 92,2 % ($p < 0,001$) вища з великого. Для гранульози з фолікулів яєчника «свіжої овуляції», незалежно від розміру з яких вона вилучена, характерна низька активність ензиму (0,24 - 0,27 мкмоль/ хв×мг протеїну). Клітини з фолікулів яєчників «фолікулярного росту» і «пізнього жовтого тіла» за культивування проявляють майже однакову активність ГПО (відповідно, 0,57 - 0,72 і 0,80 - 1,01 мкмоль/ хв×мг протеїну), різниця між значеннями - 20,1 - 20,8 % знаходиться в межах похибки середнього арифметичного.

Активність каталази гранульози з яєчника «фолікулярного росту» з фолікулів менше 7 мм однакова (0,30 мкмоль/ хв×мг протеїну) і на 40,0 % ($p < 0,01$) вища з великого. У інших клітинах, отриманих з різних фолікулів та фізіологічних станів яєчників, не виявлено вірогідної різниці за активністю ензиму.

Отже, клітини отримані з великого фолікула яєчників «фолікулярного росту» та «пізнього жовтого тіла» характеризуються стабільно високою активністю досліджених ензимів АОЗ, що свідчить про високий рівень антиоксидантного захисту культури гранульози. Підвищена активність СОД, КАТ і понижена ГПО у гранульозі з всіх фолікулів яєчника «свіжої овуляції», низька активність СОД та ГПО з великого і середнього - «раннього жовтого тіла» вказують на дисбаланс окисних процесів в клітинах й понижену здатність до виживання.

Активність ензимів антиоксидантного захисту забезпечують окремі ізономи, які в процесі електрофоретичного розділення проявляються на фореграмах окремими смугами і характеризуються властивою ензиму активністю. Зокрема, на фореграмах СОД гранульози виявляється 5 - 6 смуг протеїнів з активністю ензиму (рис. 3.4). Ізономи за електрофоретичною

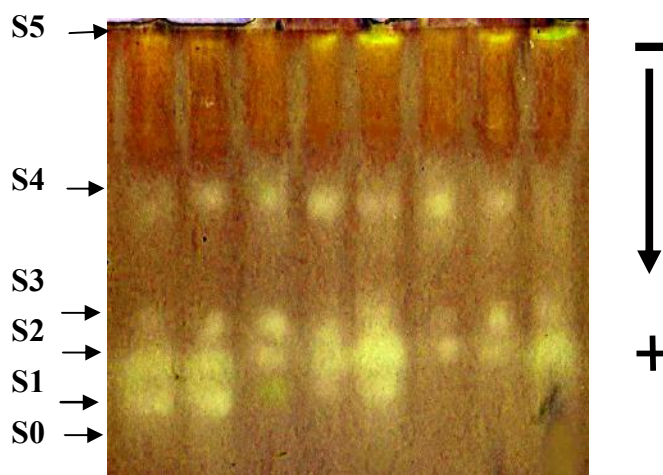


Рис. 3.4. Ізономи СОД клітин гранульози: S5; S4; S3; S2; S1; S0

рухливістю й, відповідно, величиною молекули, відповідають: позаклітиній,

мітохондріальній та цитозольній СОД. При цьому, залежно від фізіологічного стану яєчника у клітинах гранульози кількість смуг активних протеїнів, інтенсивність проявлення в ПААГ та їх вміст неоднакові. Так, зона рухливості цитозольної ізоформи СОД представлена в основному трьома протеїнами ензиму S1, S2 і S3. Крім того, у культурі клітин гранульози, яка отримана з яєчника «фолікулярного росту» за культивування проявляється додатковий, найбільш рухливий в електричному полі, ізозим Cu,Zn-СОД – S0. В зоні рухливості мітохондріальної та позаклітинної СОД виявлено по одній смузі активних протеїнів ензиму, відповідно, S4 (Mn-СОД) і S5 (ES-СОД).

Поряд з якісною відмінністю спектру ізозимів відрізняється й їх вміст. Зокрема, за культивування гранульози з фолікулів яєчника «свіжої овуляції» високий вміст S3 ($29,3 \pm 7,06$ %) і понижений ($6,7 \pm 0,72$ %) – S5 (позаклітинного; табл. 3.10). У культурі клітин з інших фізіологічних станів яєчників, порівняно

Таблиця 3.10

Вміст ізоформ СОД в культурі клітин гранульози залежно від фізіологічного стану яєчника, %; $M \pm m$

Фізіологічний стан яєчника	n	Вміст ізозимів				
		Cu,Zn-СОД; СОД1			Mn-СОД	ES-СОД
		S1	S2	S3	S4	S5
свіжа овуляція	9	$15,7 \pm 2,40$	$18,7 \pm 7,66$	$29,3 \pm 7,06$	$29,7 \pm 7,09$	$6,7 \pm 0,72$
раннє жовте тіло	11	$13,7 \pm 1,10$	$13,3 \pm 3,41$	$15,7 \pm 1,78$	$44,7 \pm 5,36^*$	$12,7 \pm 1,19^{**}$
пізнє жовте тіло	22	$16,1 \pm 1,90$	$22,6 \pm 2,75^*$	$15,7 \pm 1,70$	$32,0 \pm 2,76$	$13,6 \pm 1,74^{***}$
фолікулярний ріст	93	$18,6 \pm 1,20^{**}$	$19,9 \pm 1,24$	$19,7 \pm 1,29$	$31,3 \pm 1,59$	$10,5 \pm 0,69^{***}$

зі «свіжою овуляцією», навпаки, вміст S3 нижчий на 9,6 – 13,6 %, а S5 в 1,5 – 2 рази ($p < 0,01 - 0,001$). Крім того, більш високий вміст S1 у клітин з яєчників «фолікулярного росту» ($18,6 \pm 1,20$ %), менший з «пізнього жовтого тіла» та «свіжої овуляції», відповідно, 15,7 і 16,1 %, а найнижчий ($13,7 \pm 1,10$ %) з «раннього жовтого тіла». Різниця між мінімальною і максимальною величинами значення 4,9 % ($p < 0,01$). Подібна відмінність встановлена за

вмістом S2: високий ($22,6 \pm 2,75$ %) у клітин з «пізнього жовтого тіла», нижчий на 2,7 – 3,9 % з «фолікулярного росту» та «свіжої овуляції» і найменший ($13,3 \pm 3,41$ %) з «раннього жовтого тіла». Різниця між вмістом S2 культури клітин отриманої з яєчників «пізнього» і «раннього жовтого тіл» становить 9,3 % ($p < 0,05$). Вміст Mn-SOD у клітин з яєчника «раннього жовтого тіла» максимальний ($44,7 \pm 5,36$ %) і на 12,7 – 15,0 % ($p < 0,05$) нижчий з інших фізіологічних станів статевих залоз. У гранульозі з яєчника «свіжої овуляції» вміст ES-SOD ($6,7 \pm 0,72$ %) найнижчий і на 3,8 – 6,9 % ($p < 0,01 - 0,001$) вищий у клітин з інших фізіологічних станів статевих залоз. Таким чином, для гранульози з яєчника «фолікулярного росту» за культивування характерний стабільно високий вміст Cu,Zn- та ES-SOD і понижений Mn-SOD; «пізнього жовтого тіла» – підвищений вміст S2 Cu,Zn- і ES-SOD; «раннього жовтого тіла» – максимально високий вміст Mn- і ES-SOD та понижений Cu,Zn-SOD; «свіжої овуляції» – високий вміст S3 Cu,Zn-SOD та низький Mn- і ES-SOD.

Отримані результати свідчать про високу здатність клітин гранульози з яєчника «фолікулярного росту» за культивування захищати внутрішньоклітинні компоненти від $O_2^{\bullet-}$ й ефективно їх перетворювати. При цьому, нагромадження супероксиданіону в мітохондріях низьке й, відповідно, понижений вміст мітохондріального ізоциму SOD. У клітин гранульози з інших фізіологічних станів статевої залози за культивування активуються процеси утворення $O_2^{\bullet-}$: в цитозолі - з яєчників «пізнього жовтого тіла» та «свіжої овуляції» і в мітохондріях – з «раннього жовтого тіла». Крім того, для гранульози з яєчника «свіжої овуляції» характерний низький захист від $O_2^{\bullet-}$ зовнішньої поверхні мембрани клітин.

Подібні відмінності виявлені при дослідженні вмісту ізоцимів SOD у клітинах з урахуванням розміру фолікулів, з яких вони вилучені. Так, для культури гранульози з фолікулів більше 7 мм, порівняно з меншими, яєчника «свіжої овуляції» вміст S1 і S3 вищий, відповідно, на 6,0 – 11,0 % та 21,0 – 29,0 %, S2 і S4 нижчий на 24,0 – 31,0 та 25,0 – 27,0 % (табл. 3.11). У клітинах гранульози з фолікулів 4 – 7 мм яєчника «раннього жовтого тіла», порівняно

Вміст ізозимів СОД в клітинах гранульози залежно від розміру фолікулів з яких вони отримані і фізіологічного стану яєчника, %; $M \pm m$

Стан яєчника	мм	n	Вміст ізозимів				
			S1	S2	S3	S4	S5
«свіжа овуляція»	>7	3	21,0±5,17	6,0±0,47***	46,0±0,94	20,0±0,94	7,0±0,35
	4-7	3	11,0±1,18	37,0±1,41	25,0±1,90	22,0±1,89	5,0±0,24
	4<	3	15,±0,94	13,0±1,30	17,0±0,94	47,0±1,20	8,0±0,47
«раннє жовте тіло»	>7	5	15,0±1,89	18,0±1,31	20,0±0,71	32,0±1,89	15,0±0,94
	4-7	3	15,0±0,71	5,0±0,47***	13,0±1,43***	54,0±2,36	13,0±1,18
	4<	3	9,0±0,72*	18,0±2,36	14,0±0,94***	48,0±1,89	11,0±1,33
«пізнє жовте тіло»	>7	9	16,2±2,20	23,4±3,32	14,8±2,73	30,6±3,29	15,0±2,42
	4-7	6	18,8±3,80	21,0±5,55	17,4±2,93	35,0±4,66	7,8±1,37
	4<	7	13,4±3,60	22,4±5,79	15,8±1,58	31,6±6,48	16,8±3,03
«фолікулярний ріст»	>7	33	22,8±2,10	20,1±2,03	18,0±1,93	28,3±2,10	10,8±1,10
	4-7	29	18,1±1,90	19,9±2,37	21,1±2,93	31,2±3,56	9,7±1,31
	4<	31	15,2±1,80	19,3±2,26	20,7±2,00	34,4±2,84	10,4±1,32

з малими і великими, на 13,0 % менший вміст S2 і на 6,0 – 22,0 % більший S4. При цьому, вміст S3 і S5, відповідно, вищий на 6,0 – 7,0 % і 2,0 – 4,0 % у гранульозі з фолікулів більше 7 мм, порівняно з меншими. Культура клітин з яєчника «пізнього жовтого тіла», не залежно від розміру фолікулів, характеризується майже однаковим вмістом ізозимів СОД: 13,4 – 18,8 % - S1, 21,0 – 23,4 % - S2, 14,8 – 17,4 % - S3, 30,6 – 35,0 % - S4. Однак, вміст S5 в культурі з середнього фолікула, порівняно до інших за розміром, нижчий на 7,2 - 9,0 % ($p < 0,05$). У гранульозі з яєчника «фолікулярного росту» зі збільшенням фолікула від менше 4 до більше 7 мм при культивуванні зростає вміст S1 (на 7,5 %; $p < 0,01$) і на 6,1 % знижується S4.

Отже, за культивування гранульози зі статевої залози «фолікулярного росту» в клітинах зростає окисне навантаження на цитозольні структури й

проявляється тенденція до послаблення захисту мітохондрій від $O_2^{\cdot-}$. У гранульозі з середніх фолікулів яєчників «пізнього жовтого тіла» існує понижена здатність утилізувати $O_2^{\cdot-}$ у позаклітинному просторі й, відповідно, захищати зовнішню поверхню мембрани клітин, а «раннього жовтого тіла» – як знижена здатність перетворювати $O_2^{\cdot-}$ в цитозолі, так і надмірне його утворення в мітохондріях. Для клітин гранульози з яєчника «свіжої овуляції» характерне порушення балансу між вмістом окремих ізоформ СОД, що зумовлено, ймовірно, запрограмованим впливом статевих гормонів (гонадотропінів) на метаболічні процеси *in vivo* (ще до вилучення клітин з фолікулів).

Дослідженням ізозимів ГПО виявлено, що активність ензиму проявляється на фореграмах 5 - 6 безбарвними смугами, різної величини та інтенсивності (рис. 3.5). При цьому, активність прояву смуг ізозимів залежить

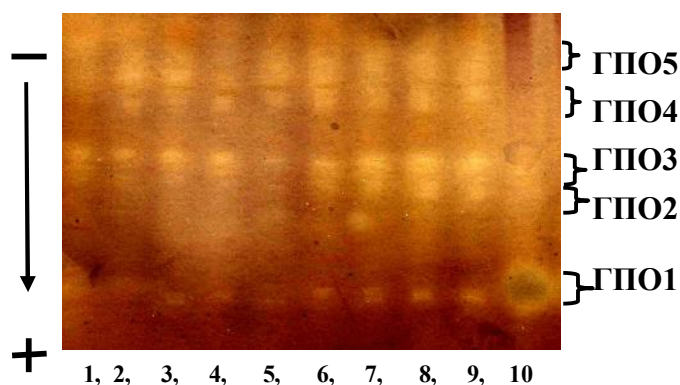


Рис. 3.5. Ізозими ГПО культури клітин гранульози з фолікулів яєчників корів: 1-9 клітини гранульози, 10 – еритроцити крові корови

від розміру фолікулів і фізіологічного стану яєчників з яких вилучені клітини гранульози. Зокрема, найвищим вмістом ГПО1 характеризуються клітини з яєчників «фолікулярного росту» ($24,2 \pm 2,13$ %), нижчими на 4,7 - 5,9 % з «пізнього і раннього жовтого тіла» і найменшим ($14,7 \pm 2,93$ %) зі «свіжої овуляції» (табл. 3.12). Різниця між мінімальним і максимальним значеннями становить 9,5 % ($p < 0,01$). Вміст ГПО2 високий у гранульозі з яєчника «раннього жовтого тіла» ($31,3 \pm 5,88$ %), майже однаковий з «пізнього жовтого тіла» і «фолікулярного росту» (23,5 - 25,9 %), а найнижчий зі «свіжої овуляції»

Вміст ізозимів ГПО в культурі клітин гранульози залежно від фізіологічного стану яєчника, %; $M \pm m$

Ізозими ГПО	Вміст ізозимів			
	«свіжа овуляція», n =9	«раннє жовте тіло», n = 15	«пізнє жовте тіло», n = 15	«фолікулярний ріст», n = 79
ГПО 5	22,7±6,60	16,8±4,00	19,9±5,90	15,8±2,10
ГПО 4	11,2±3,80	10,5±2,10	20,9±5,50	14,3±1,70
ГПО 3	29,8±5,20	21,9±4,70	17,4±4,30	19,5±1,90
ГПО 2	21,5±3,73	31,3±5,88	23,5±5,77	25,9±2,64
ГПО 1	14,7±2,93 ^{**}	19,5±4,92	18,3±3,07	24,2±2,13

(21,5±3,73 %). Різниця між мінімальним і максимальним значеннями становить 9,8 % ($p > 0,05$). Клітини з яєчника «пізнього жовтого тіла» характеризуються найнижчим вмістом ГПО3 (17,4±4,30 %), а найвищим (29,8±5,20 %) зі «свіжої овуляції» і майже однаковим (19,5 - 21,9 %) з «раннього жовтого тіла» і «фолікулярного росту». Різниця між мінімальним і максимальним значеннями становить 12,4 % ($p > 0,05$). У клітин з яєчника «пізнього жовтого тіла» вміст ГПО4 високий (20,9±5,50 %), на 6,6 % нижчий з «фолікулярного росту» і низький (10,5 - 11,2 %) зі «свіжої овуляції» і «раннього жовтого тіла». Вищі величини значень ГПО5 у гранульозі з яєчників «пізнього жовтого тіла» і «свіжої овуляції» (19,9 - 22,7%) і менші на 3,1 - 5,9 % з «раннього жовтого тіла» і «фолікулярного росту». Отже, вміст ізозимів ГПО у культурі клітин залежить від фізіологічного стану яєчників й характеризує інтенсивність утворення й знищення H_2O_2 і, вцілому, напруженість окисних процесів у гранульозі.

Подібні відмінності виявлені при дослідженні вмісту ізозимів ГПО у культурі клітин з урахуванням розміру фолікулів та фізіологічного стану яєчників, з яких вони отримані. Так, у клітин гранульози з фолікулів більше 7 мм яєчників «свіжої овуляції» і «раннього жовтого тіла» та менше 4 мм «пізнього жовтого тіла» понижений вміст ГПО1 (11,5 - 13,2 %), на 5,3 - 6,5 %

вищий з менше 4 мм «свіжої овуляції» та «раннього жовтого тіла», 4 – 7 мм «фолікулярного росту» та більше 7 мм «пізнього жовтого тіла», а найвищий (24,9 - 26,4 %) з малого і великого фолікулів «фолікулярного росту», середніх «раннього та пізнього жовтого тіла» (табл. 3.13). Різниця між мінімальним і

Таблиця 3.13

Вміст ізозимів ГПО в клітинах гранульози залежно від фізіологічного стану яєчника і розміру фолікулів, з яких вони отримані, %; $M \pm m$

Яєчн ик	мм	Порядковий номер та вміст ізозимів ГПО					
		n	1	2	3	4	5
«свіжа овуляція»	>7	3	11,5±4,62	26,5±2,47	20,5±4,90	12,5±8,10	29,0±5,70
	4-7	3	14,0±6,36	9,5±3,18*	42,5±24,40	12,5±7,40	21,5±14,10
	4<	3	18,0±1,77	28,5±0,35	27,0±13,40	8,5±4,00	18,0±11,30
«раннє жовте тіло»	>7	5	13,2±3,86	24,4±4,75	29,0±8,50	9,2±1,70	24,2±8,00
	4-7	5	25,6±8,01	26,0±9,11	19,4±6,20	13,6±4,10	15,4±6,30
	4<	5	19,8±9,78	42,6±11,31	17,8±6,80	9,0±3,50	10,8±1,30
«пізнє жовте тіло»	>7	6	19,0±3,91	27,8±6,00	24,7±6,90	18,8±4,90	9,7±3,80*
	4-7	4	24,9±6,51	6,5±2,08*	15,8±7,20	14,8±2,30	38,0±11,90
	4<	5	14,6±3,31	31,2±11,99	7,0±2,80*	28,8±13,4	18,4±9,30
«фолікуляр ний ріст»	>7	29	26,1±4,25	24,0±4,98	14,2±2,50	18,6±3,70	17,1±3,90
	4-7	26	20,3±2,93	31,8±4,88	21,6±2,60	10,5±1,90	15,8±3,00
	4<	24	26,4±3,75	21,8±3,54	24,5±4,80	12,9±2,40	14,4±4,40

максимальним значеннями статистично вірогідна ($p < 0,05 - 0,01$). Максимальний вміст ГПО2 в клітинах малого фолікула «раннього жовтого тіла» (42,6±11,31 %), а найнижчий з середніх «пізнього жовтого тіла» і «свіжої овуляції» (6,5 - 9,5 %). Різниця між мінімальним і максимальним значеннями статистично вірогідна ($p < 0,05$). Для гранульози, яка отримана з фолікулів іншого розміру, не залежно від фізіологічного стану яєчника, вмісту ГПО2 знаходиться в межах 21,8 - 31,8 %. Подібна залежність встановлена при дослідженні ГПО3 - максимальне значення у гранульозі з середнього фолікула

яєчника «свіжої овуляції» ($42,5 \pm 24,40$ %), а низьке ($7,0 \pm 2,80$ %) з малого фолікула «пізнього жовтого тіла». Середні величини вказаного іозиму ($20,5 - 29,0$ %) характерні для клітин з великих фолікулів «свіжої овуляції», «раннього» і «пізнього жовтого тіла», середніх - «раннього жовтого тіла» і «фолікулярного росту» та малих - «свіжої овуляції» і «фолікулярного росту». Вміст ГПО4 у гранульозі з яєчників «свіжої овуляції» і «раннього жовтого тіла», не залежно від розміру фолікулів та малого «пізнього жовтого тіла» і малого та середнього - «фолікулярного росту» знаходився в межах $8,5 - 14,8$ %. Вищий на $4,0 - 10,3$ % вміст іозиму з великих фолікулів «пізнього жовтого тіла» і «фолікулярного росту», а найвищий з малого яєчника «пізнього жовтого тіла» ($28,8 \pm 13,40$ %). Найвищий вміст ГПО5 виявлено у культурі клітин з фолікулів $4 - 7$ мм «пізнього жовтого тіла» ($38,0 \pm 11,90$ %), менший на $9,0 - 13,8$ % з більше 7 мм яєчників «раннього жовтого тіла» і «свіжої овуляції», ще менший і майже однаковий з фолікулів менше 7 мм «раннього жовтого тіла» та «фолікулярного росту» ($10,0 - 15,8$ %). Таким чином, вміст іозимів ГПО, залежно від розміру фолікула і фізіологічного стану яєчника, вказує на здатність гранульози підтримувати оптимальний рівень утворення і знищення активних сполук Оксигену (H_2O_2 і OH^-) та забезпечувати виживання клітин.

Виявлено, що активність КАТ проявляється на фореграмах двома світлими не зафарбованими (чи слабо зафарбованими) смугами протеїнів, різної площі та електрофоретичної рухливості (рис. 3.6). Інтенсивність прояву

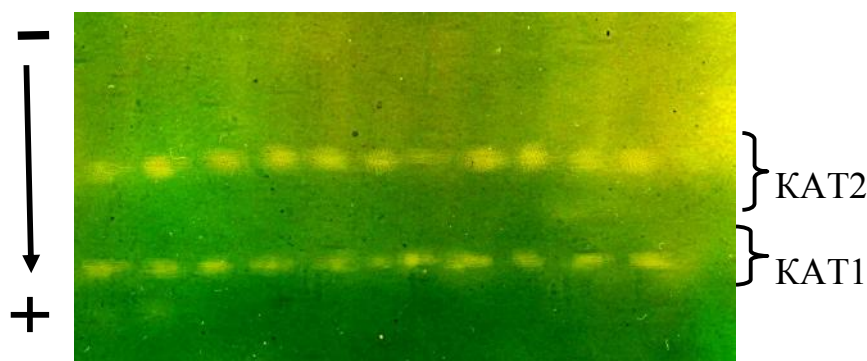


Рис. 3.6. Іозими каталази культури клітин гранульози фолікулів яєчників корів

смуг ізозимів не однакова та залежить від розміру фолікулів і фізіологічного стану яєчників з яких вилучені клітини гранульози. Так, вміст ізозимів КАТ1 - $36,7 \pm 2,65$ % та КАТ2 - $63,3 \pm 2,65$ % (табл. 3.14). При цьому, вказані середні

Таблиця 3.14

Вміст ізозимів КАТ у культурі клітин залежно від фізіологічного стану яєчника, %; $M \pm m$

Фізіологічний стан яєчника	n	Ізозими	
		КАТ1	КАТ2
«свіжа овуляція»	9	$30,2 \pm 9,35$	$69,8 \pm 9,35$
«раннє жовте тіло»	15	$35,4 \pm 9,73$	$64,6 \pm 9,73$
«пізнє жовте тіло»	19	$35,8 \pm 8,47$	$64,3 \pm 8,48$
«фолікулярний ріст»	116	$36,7 \pm 3,11$	$63,3 \pm 3,10$

величини КАТ1 і КАТ2 характерні для клітин з яєчника «фолікулярного росту». У гранульозі з «раннього» та «пізнього жовтого тіла», порівняно з «фолікулярним ростом» на 0,9 - 1,3 % нижчий вміст КАТ1 і на 1,0 - 1,3 % вищий КАТ2. Для клітин з яєчника «свіжої овуляції» характерний понижений вміст КАТ1 і підвищений КАТ2. Різниця між мінімальними і максимальними величинами значень ізозимів становить - 6,5 %. Отже, вміст ізозимів КАТ клітин слабо залежить від фізіологічного стану яєчника з якого вони вилучені.

На вміст ізозимів КАТ, з урахуванням фізіологічного стану яєчника, впливає розмір фолікулів з яких аспірована гранульоза. Зокрема, понижений вміст КАТ1 у клітин з фолікулів 4 – 7 мм яєчника «свіжої овуляції» та менше 4 мм «раннього жовтого тіла» ($11,3 - 13,4$ %; табл. 3.15). Відповідно, вміст КАТ2 у вказаній культурі максимально високий ($86,6 - 88,7$ %). Майже однакові величини вмісту ізозимів встановлені у гранульозі з фолікулів менше 7 мм «фолікулярного росту», 4 – 7 мм «раннього жовтого тіла» і більше 7 мм «свіжої овуляції»: КАТ1 - $40,8 - 58,8$ %, КАТ2 - $41,2 - 59,2$ %. Різниця між мінімальними і максимальними величинами КАТ1 становить 47,5 % ($p < 0,05$). Для клітин фолікулів менше 4 мм «свіжої овуляції» і більше 7 мм «фолікулярного росту»

Вміст ізозимів КАТ у культурі клітин залежно від розміру фолікула і фізіологічного стану яєчника, %; $M \pm m$

Фізіологічний стан яєчника	мм	n	Порядковий номер та вміст ізозимів	
			КАТ1	КАТ2
«свіжа овуляція»	> 7	3	48,3±5,42	51,7±5,42
	4 - 7	3	11,3±2,33*	88,7±2,33
	4 <	3	31,0±22,88	69,0±22,88
«раннє жовте тіло»	> 7	5	34,0±15,89	66,0±15,89
	4 - 7	5	58,8±14,66	41,2±14,66
	4 <	5	13,4±8,26*	86,6±8,26
«пізнє жовте тіло»	> 7	7	36,6±14,00	63,7±14,02
	4 - 7	7	36,7±14,42	63,3±14,42
	4 <	5	33,6±11,72	66,4±11,72
«фолікулярний ріст»	> 7	44	29,6±4,86	70,4±4,86
	4 - 7	37	40,8±5,76	59,2±5,74
	4 <	35	41,2±5,70	58,8±5,69

та всіх розмірів «пізнього жовтого тіла» характерні майже однакові величини КАТ1 - 29,6 - 36,7 %. Отже, мінімальним вмістом КАТ1, як і відповідно, максимальним КАТ2 характеризуються клітини з середнього фолікула яєчника «свіжої овуляції» та малого «раннього жовтого тіла».

Результати досліджень підрозділу опубліковані у 2 статтях [297].

3.4. Спектр протеїнів культури клітин гранульози з фолікулів яєчників корів

Відомо, що за культивування клітин ссавців в склад середовища додають різного походження протеїни та компоненти протеїнової природи [298, 299].

Так, для культивування статевих клітин самок сільськогосподарських тварин, зокрема корів, як окремо, так і спільно з іншими клітинами (кумулясом чи гранулозою) використовують еструсну сироватку, фолікулярну рідину, альбумін та інші протеїни [300, 301, 302, 303]. Вказані компоненти забезпечують подібність складу середовища культивування до природних умов існування, а також використання клітинами протеїнів як структурних і транспортних засобів для біологічно активних речовин, так і факторів, які стимулюють ріст і метаболізм [9, 304].

Встановлено, що за вихідного вмісту загального протеїну у середовищі ($15,2 \pm 1,04$ мг/мл) така ж величина значення залишалась за культивування в гранулозі з яєчників «фолікулярного росту» і на 15,8 % вища - з «раннього жовтого тіла» та на 22,2 і 34,2 % нижча, відповідно, з «пізнього жовтого тіла» і «свіжої овуляції» (табл. 3.16). При цьому, вміст загального протеїну в культурі гранулози залежав не тільки від фізіологічного стану яєчника, але й від розміру фолікула з яких вилучені клітини. Так, в культурі гранулози з малого фолікула яєчника «свіжої овуляції» вміст $8,2 \pm 1,63$ мг/мл, що на 2,9 - 3,7 % нижче ніж з фолікулів більше 4 мм. На відміну, у культурі клітин з середнього фолікула «раннього жовтого тіла» вміст загального протеїну максимальний ($21,0 \pm 4,15$ мг/мл), а з малого і великого, відповідно, на 4,9 і 3,1 % нижчий.

Подібні зміни встановлені за «пізнього жовтого тіла», тенденційно вища величина показника з середнього фолікула ($13,3 \pm 5,17$ мг/мл) і на 0,5 - 2,5 % нижча у малому і великому. За культивування гранулози з яєчника «фолікулярного росту» вміст загального протеїну, не залежно від розміру фолікула, становив 15,1 - 16,3 мг/мл. Отже, за відсутності вірогідної різниці між величинами вмісту загального протеїну в культурі клітин залежно від фізіологічного стану яєчника, відносно розміру фолікулів вища величина значення ($21,0 \pm 4,15$ мг/мл) проявляється у гранулози з фолікула 4 - 7 мм статевої залози «раннього жовтого тіла», а найнижча ($8,2 \pm 1,63$ мг/мл) за менше 4 мм «свіжої овуляції». Різниця між вказаними величинами становить 60,9 % ($p < 0,01$). Встановлені зміни вмісту загального протеїну в культурі

Вміст загального протеїну в культурі клітин гранульози, $M \pm m$

Фізіологічний стан яєчника	Розмір фолікула, мм	n	Вміст загального протеїну, мг/мл
«свіжа овуляція»	> 7	9	11,1±3,32
	4 - 7	8	11,9±3,64
	4 <	9	8,2±1,63
в середньому		26	10,4±2,86
«раннє жовте тіло»	> 7	11	17,9±4,98
	4 - 7	11	21,0±4,15
	4 <	11	16,1±3,52
в середньому		33	18,3±4,22
«пізнє жовте тіло»	> 7	14	10,8±2,96
	4 - 7	13	13,3±5,17
	4 <	14	12,8±5,03
в середньому		41	12,3±4,38
«фолікулярний ріст»	> 7	29	15,1±2,15
	4 - 7	27	16,3±2,18
	4 <	30	16,1±2,60
в середньому		86	15,8±2,31

гранульози залежно від розміру фолікула свідчать про значно вищу протеїнсинтезуючу здатність клітин з середніх фолікулів яєчника «раннього жовтого тіла», порівняно з іншими. І навпаки, гранульоза з малого фолікула яєчника «свіжої овуляції» за культивування інтенсивно використовує протеїни середовища.

Поряд з відмінністю вмісту загального протеїну в культурі клітин відрізнявся якісно й кількісно спектр його розчинних компонентів (рис. 3.7). Зокрема, в зоні рухливості γ -глобулінів виявлено 3 фракції протеїнів з вмістом, відповідно, γ_1 - 8,2±0,48, γ_2 - 11,4±0,50 і γ_3 - 11,7±0,55 %. При цьому, у культурі клітин, не залежно від фізіологічного стану яєчників, вміст γ_3

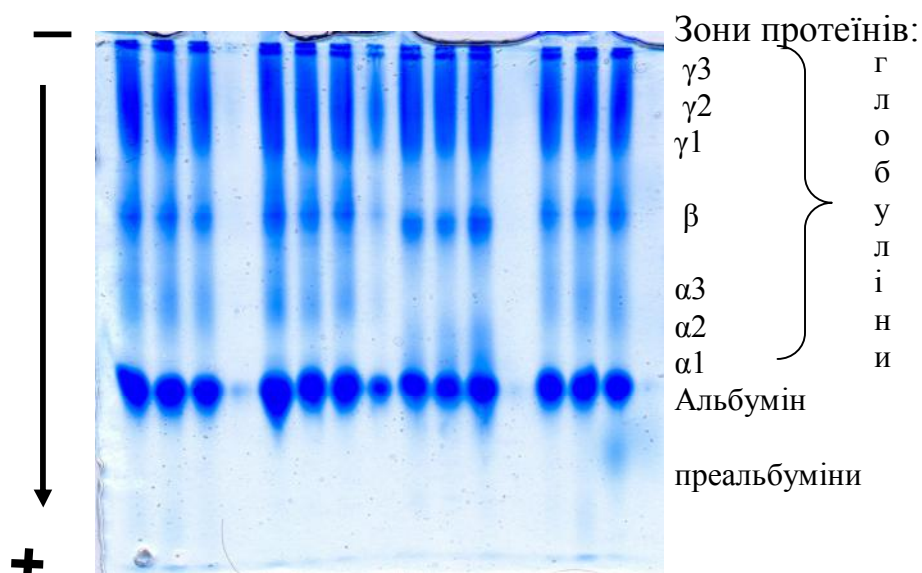


Рис. 3.7. Розчинні протеїни культури клітин гранульози

однаковий (10,8 - 12,6 %; табл. 3.17). Аналогічно, вміст $\gamma 2$ також не відрізнявся

Таблиця 3.17

Вміст розчинних протеїнів у культурі клітин гранульози залежно від фізіологічного стану яєчника, %; $M \pm m$

Фракції		№	Фізіологічний стан яєчника			
			«свіжа овуляція», n = 26	«раннє жовте тіло», n = 33	«пізнє жовте тіло», n = 41	«фолікулярний ріст», n = 86
Глобуліни:	γ	3	12,3±1,71	12,1±1,02	12,6±1,49	10,8±0,83
		2	12,2±1,40	12,9±1,20	11,2±1,30	10,8±0,90
		1	5,7±0,70 ^{***}	7,5±0,87	6,6±0,88	9,9±0,85
	β	1	8,8±1,11 ^{***}	9,6±1,21 ^{***}	11,1±1,28 ^{**}	16,8±1,33
		3	8,8±1,01	8,4±0,77	6,5±0,71	6,8±0,56
	α	2	7,0±0,91	7,6±0,92	6,4±0,74	5,6±0,52
		1	11,6±1,64	7,5±0,78 [*]	7,3±0,84 [*]	7,4±0,76 [*]
Альбумін		1	18,7±1,40 ^{**}	24,8±2,50	24,7±2,40	25,3±1,50
Преальбуміни		1	14,1±1,30	17,9±3,30	16,2±2,70	10,1±1,30 [*]

і знаходився в межах 10,8 - 12,9 %. Слід зауважити, що понижені значення $\gamma 3$ - і $\gamma 2$ -глобулінів виявлені в культурі клітин з яєчника «фолікулярного росту». Вміст $\gamma 1$ низький ($5,7 \pm 0,70$ %) у гранульозі з яєчників «свіжої овуляції», вищий на 1,8 % з «раннього жовтого тіла» і максимальний ($9,9 \pm 0,85$ %) з «фолікулярного росту». Різниця між максимальною і мінімальною величиною - 4,2 % ($p < 0,001$).

Таким чином, культура клітини з яєчників «фолікулярного росту» характеризується пониженим вмістом $\gamma 3$ - і $\gamma 2$ - та вірогідно вищим $\gamma 1$ -глобулінів. Вміст β -глобулінів у культурі клітин з яєчників «свіжої овуляції» і «раннього жовтого тіла» низький (8,8 - 9,6 %), вищий на 1,5 - 2,3 % з «пізнього жовтого тіла» і найвищий $16,8 \pm 1,33$ % з «фолікулярного росту». Різниця між низькими і високим значеннями 7,2 - 8,0 % ($p < 0,001$). Отже, культура клітини гранульози з яєчника «фолікулярного росту» характеризуються підвищеним вмістом металотранспортуючих протеїнів.

При дослідженні α -глобулінів в культурі клітин виявлено 3 фракції з вмістом: $\alpha 1$ - $8,0 \pm 0,47$, $\alpha 2$ - $6,2 \pm 0,34$ і $\alpha 3$ - $7,2 \pm 0,35$ %. При цьому, вміст $\alpha 1$ -глобулінів за культивування клітин з статевих залоз «раннього і пізнього жовтого тіла» та «фолікулярного росту» однаковий (7,3 - 7,5 %) і вищий на 4,1 - 4,3 % ($p < 0,05$) зі «свіжої овуляції». Подібні зміни встановлені при вивченні вмісту $\alpha 2$ - і $\alpha 3$ -глобулінів: у клітин з яєчників «фолікулярного росту» і «пізнього жовтого тіла» майже однакова (5,6 - 6,8 %) величина значення і на 0,6 - 2,3 % вища зі «свіжої овуляції» та «раннього жовтого тіла». Таким чином, клітини гранульози отримані з яєчників «свіжої овуляції» характеризуються вірогідно вищим вмістом протеїнів зони $\alpha 1$ -глобулінів.

Однак, для культури клітин з яєчників «фолікулярного росту», «раннього» та «пізнього жовтого тіла» характерний вищий вміст альбуміну (24,7 - 25,3 %) і нижчий на 6,0 - 6,6 % ($p < 0,05 - 0,01$) зі «свіжої овуляції».

Вміст преальбумінів у гранульозі зі статевої залози «фолікулярного росту» найнижчий ($10,1 \pm 1,30$ %), вищий на 4,0 - 6,1 % ($p < 0,05$) зі «свіжої овуляції» і «пізнього жовтого тіла», а найвищий ($17,9 \pm 3,30$ %) з «раннього

жовтого тіла». Отже, культура клітин з яєчника «фолікулярного росту» характеризується низьким вмістом білків з малим розміром молекули і високою електрофоретичною рухливістю.

Також відрізняється й вміст фракцій протеїнів культури клітин залежно від розміру фолікула, з яких вилучена гранульоза. Зокрема, вміст $\gamma 3$ глобулінів у культурі клітин максимальний ($17,0 \pm 3,47$ %) з великого фолікула яєчника «пізнього жовтого тіла», нижчий на 3,0 - 4,0 % з великого і малого «свіжої овуляції», а найменший ($9,5 \pm 1,31$ %) з середнього «фолікулярного росту» (табл. 3.18). Різниця між мінімальною і максимальною величинами - 7,5 % ($p < 0,05$).

Не виявлено відмінностей між вмістом $\gamma 2$ -глобулінів у клітин залежно від розміру фолікулів: величини значень становили від 10,2 до 14,9 %, різниця між ними - 4,7 %, що в межах похибки середнього арифметичного.

Вміст $\gamma 1$ - глобулінів низький ($4,7 \pm 0,66$ %) у культурі клітин, яка отримана з середнього фолікула «свіжої овуляції», вища на 0,4 – 0,9 % з великих фолікулів «раннього і пізнього жовтого тіла» і «свіжої овуляції», а максимальна (10,6 - 10,8 %) з малого і середнього - «фолікулярного росту». Різниця між мінімальною і максимальними величинами вмісту $\gamma 1$ -глобулінів у культурі гранульози становить 6,1 % ($p < 0,01$). Аналіз вмісту β -глобулінів гранульози залежно від розміру фолікула свідчить, що максимальним значенням ($16,1 \pm 2,62$ %) характеризується культура клітин з середнього фолікула яєчника «фолікулярного росту», на 4,5 - 6,0 % нижчим з великих, не залежно від фізіологічного стану яєчника, а найнижчим ($7,0 \pm 1,41$ %) з малого фолікула «свіжої овуляції». Різниця між мінімальним і максимальним значеннями - 9,1 % ($p < 0,01$). При дослідженні $\alpha 3$ -глобулінів не виявлено відмінностей їх вмісту в культурі клітин залежно від розміру фолікулів: величини значень в межах 5,9 - 9,5 %, різниця становить 4,6 % ($p > 0,05$). Вміст $\alpha 2$ -глобулінів в гранульозі залежно від розміру фолікулів найвищий ($9,0 \pm 1,35$ %) з діаметру менше 4 мм яєчника «свіжої овуляції», на 0,9 – 1,0 % менший з великого і малого «раннього жовтого тіла», на 1,9 - 3,5 % нижчий з середніх «фолікулярного росту», «пізнього жовтого тіла» і «свіжої овуляції» і найменший ($4,8 \pm 1,03$ %) з

Вміст фракцій розчинних протеїнів у культурі клітин залежно від розміру фолікулів з яких отримана гранульоза, %; M±m

Стан яєчника	Фолікул, мм	n	Фракції								
			Глобуліни і номер їх фракції							Альбумін	Преальбуміни
			γ-			β-	α-				
			3	2	1	1	3	2	1	1	1
«свіжа овуляція»	> 7	9	14,0± 3,70	13,7± 2,60	5,3± 1,05**	11,6± 1,88	8,3± 1,89	5,2± 1,09	8,6± 2,36	18,0± 2,10**	15,3± 2,70
	4-7	8	9,8± 1,83	14,9± 2,40	4,7± 0,66**	7,7± 1,76**	9,5± 1,61	6,9± 1,80	13,6± 1,56	20,3± 2,40	16,6± 1,50
	4 <	9	13,0± 2,31	12,0± 1,70	7,1± 1,40	7,0± 1,41**	9,0± 1,42	9,0± 1,35	13,9± 3,39	18,2± 2,60*	10,7± 1,50*
«раннє жовте тіло»	> 7	11	12,7± 1,74	10,3± 1,90	5,6± 1,34*	10,4± 3,23	9,0± 0,93	8,0± 1,81	6,7± 1,24	20,4± 2,60	16,9± 4,70
	4-7	11	12,6± 1,71	10,8± 1,70	7,5± 1,81	8,4± 1,19**	7,1± 1,56	4,8± 1,03*	8,0± 1,23	20,5± 5,70	20,3± 7,30
	4 <	11	9,8± 1,95	10,5± 2,60	8,4± 1,61	8,2± 1,35**	9,1± 1,45	8,1± 1,69	7,8± 1,62	24,1± 4,50	14,1± 3,90
«пізнє жовте тіло»	> 7	14	17,0± 3,47	11,4± 2,60	5,1± 1,16**	10,1± 1,63	5,9± 1,22	5,5± 1,18	6,9± 1,46	25,6± 4,00	12,9± 1,70
	4-7	13	10,9± 1,43	12,0± 3,00	9,0± 1,88	10,1± 2,62	6,5± 1,26	7,0± 1,53	8,6± 1,86	24,2± 4,20	11,7± 1,20
	4 <	14	9,8± 2,16	9,4± 1,60	5,9± 1,45	11,1± 2,61	7,1± 1,34	6,7± 1,29	6,6± 1,19	23,1± 5,00	20,3± 7,40
«фолікулярний ріст»	> 7	29	12,5± 1,37	10,9± 1,70	8,4± 1,17	13,0± 2,27	6,0± 0,88	5,1± 0,93*	10,2± 1,92	23,0± 2,30	11,2± 2,80
	4-7	27	9,5± 1,31*	10,2± 1,40	10,8± 1,75	16,1± 2,62	6,8± 0,79	5,5± 0,71*	6,0± 0,82*	27,0± 2,50	8,6± 1,90
	4 <	30	10,4± 1,60	11,1± 1,60	10,6± 1,55	12,3± 2,12	7,5± 1,25	6,4± 1,09	6,0± 0,81*	25,4± 2,80	10,6± 2,00

фолікула 4 - 7 мм «раннього жовтого тіла». Різниця між мінімальною і максимальною величинами – 4,2 % (p < 0,05). Вміст α1-глобулінів у культурі

клітин залежно від розміру фолікулів високий (13,6 – 13,9 %) з фолікулів менше 7 мм яєчника «свіжої овуляції», на 3,7 – 7,2 % нижчий з великих, не залежно від фізіологічного стану яєчника, а найнижчий (6,0 %; $p < 0,05$) з фолікулів менше 7 мм статевої залози «фолікулярного росту».

Вміст альбуміну найнижчий (18,0 - 18,2 %) у культурі гранульози з великого та малого фолікулів яєчника «свіжої овуляції», а з фолікулів інших розмірів і фізіологічних станів статевої залози вищий на 2,1 - 9,0 %, за максимальної величини ($27,0 \pm 2,50$ %) у гранульозі з фолікула 4 - 7 мм яєчника «фолікулярного росту». Різниця між мінімальною і максимальною величиною значень статистично вірогідна ($p < 0,01$).

Дослідженням преальбумінів виявлено максимальну величину значення (20,3 %) у культивованих клітин з малих і середніх фолікулів, відповідно, яєчників «пізнього» і «раннього жовтого тіла», на 3,7 - 5,0 % меншу за більше 7 мм «свіжої овуляції», а найнижчу ($8,6 \pm 1,90$ %) з 4 - 7 мм статевої залози «фолікулярного росту». Різниця між мінімальною і максимальною величинами значень 11,7 % ($p > 0,05$). Отже, аналіз результатів досліджень свідчить, що вміст окремих фракцій розчинних протеїнів за культивування клітин, при відмінностях величин їх значень залежно від фізіологічного стану яєчника, більшою мірою визначається розміром фолікулів, з яких отримана гранульоза.

Крім змін фракцій розчинних протеїнів культури клітин, залежно від розміру фолікулів та фізіологічного стану яєчників з яких вилучена гранульоза, існують особливості вмісту структурних протеїнів (рис. 3.8). Культура клітин з яєчників «раннього» і «пізнього жовтого тіла» характеризується пониженим вмістом протеїнів більше 94,6 кДа (5,6 - 5,8 %), вищим на 1,6 - 1,8 % зі «свіжої овуляції» і найвищим ($8,4 \pm 0,68$ %) з «фолікулярного росту» (табл. 3.19). Різниця між мінімальними і максимальним значеннями становить 2,6 - 2,8 % і статистично вірогідна ($p < 0,05 - 0,01$). Подібна особливість вмісту протеїнів з ММ 94,6 кДа проявляється в гранульозі з яєчників «фолікулярного росту» де їх високе значення ($7,8 \pm 0,80$ %), нижче на 1,2 % з «пізнього жовтого тіла», а найнижчі (5,3 - 5,4 %) зі «свіжої овуляції» та «пізнього жовтого тіла». Різниця

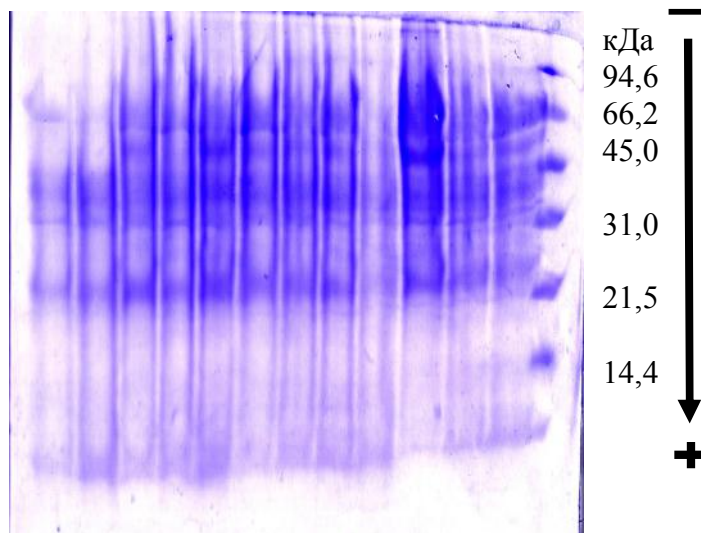


Рис. 3.8. Спектр протеїнів культури клітин гранульози

між мінімальними і максимальним значеннями - 2,4 - 2,5 % ($p < 0,05$). Для зони протеїнів 66,2 – 94,6 кДа культури з яєчника «фолікулярного росту» характерне високе значення ($9,2 \pm 0,96$ %), нижче на 1,4 - 1,8 % з яєчника «раннього і пізнього жовтого тіла» і найнижче ($5,9 \pm 0,77$ %) зі «свіжої овуляції». Різниця між мінімальним і максимальним значеннями - 2,7 - 3,3 % ($p < 0,01$). В зоні рухливості альбуміну (66,2 кДа) вміст $12,8 \pm 2,79$ % в гранульозі з яєчника «раннього жовтого тіла», нижчий на 2,3 - 3,4 % з «пізнього жовтого тіла» та «фолікулярного росту» і найнижчий ($5,4 \pm 0,74$ %) зі «свіжої овуляції». Різниця між мінімальним і максимальним значеннями - 7,4 % ($p < 0,05$). Протеїни зони 45,0 - 66,2 кДа в культурі клітин з яєчників «свіжої овуляції» і «раннього жовтого тіла» становлять 6,6 - 6,8 %, а з «пізнього жовтого тіла» і «фолікулярного росту» вищі на 1,8 - 2,1 %. Вміст протеїнів зони 45,0 кДа, незалежно від фізіологічного стану яєчника з якого вилучена гранульоза, в межах 9,7 - 11,6 %, різниця між значеннями 1,9 % ($p > 0,05$). Аналогічно, вміст протеїнів зони 31,0 – 45,0 кДа, не залежно від фізіологічного стану яєчника, в межах 6,1 - 7,5 %, різниця становить 1,4 % ($p > 0,05$). Вміст протеїнів з ММ 31,0 кДа в культурі клітин з яєчника «фолікулярного росту» високий ($7,3 \pm 1,20$ %), нижчий на 0,5 - 0,7 % з «раннього і пізнього жовтого тіла», а

Вміст протеїнів у культурі клітин гранульози залежно від фізіологічного стану яєчника, М±m

Зони, кДа	№	Вміст протеїнів за фізіологічного стану яєчника, %			
		«свіжа овуляція», n=27	«раннє жовте тіло», n =32	«пізнє жовте тіло», n =39	«фолікулярний ріст», n =88
> 94,6	13	7,4±1,54	5,6±0,77**	5,8±0,84*	8,4±0,68
94,6	12	5,3±0,60*	6,6±1,73	5,4±0,80*	7,8±0,80
66,2–94,6	11	5,9±0,77**	7,8±1,25	7,4±1,54	9,2±0,96
66,2	10	5,4±0,74*	12,8±2,79	9,4±1,76	10,5±1,07
45,0–66,2	9	6,6±0,69	6,8±0,64	8,6±0,98	8,7±0,66
45,0	8	11,6±1,23	10,5±0,89	10,2±0,87	9,7±0,69
31,0–45,0	7	6,7±0,68	6,1±0,50	6,1±0,57	7,5±0,67
31,0	6	2,9±0,56***	6,8±0,90	6,6±1,00	7,3±1,20
21,5–31,0	5	8,0±1,30	5,3±0,38*	3,45±0,44***	4,2±0,31**
21,5	4	10,6±0,90	8,1±1,00	12,7±2,10	7,6±1,50
14,4-21,5	3	23,6±1,80	18,2±1,50*	17,9±1,90*	9,4±1,10***
14,4	2	2,9±0,34	3,0±0,31	1,8±0,28***	3,7±0,24
14,4<	1	3,0±0,87*	2,4±0,21**	4,5±1,32	5,8±1,02

найнижчий (2,9±0,56 %) зі «свіжої овуляції». Різниця між мінімальним і максимальним значеннями 4,4 % (p < 0,001). Клітини з яєчника «свіжої овуляції» за культивування характеризувались високим вмістом протеїнів ММ 21,5 – 31,0 кДа (8,0±1,30 %), нижчим на 2,7 - 3,8 % (p < 0,05 - 0,01) з «раннього жовтого тіла» і «фолікулярного росту», а найнижчим (3,45±0,44 %) з «пізнього жовтого тіла». Різниця між мінімальним і максимальним значеннями 4,5 % (p < 0,001). У культивованій гранульозі з яєчників «свіжої овуляції» і «пізнього жовтого тіла» в зоні з ММ 21,5 кДа 10,6 - 12,7 % протеїнів і на 2,5 - 5,1 % (p < 0,05) менше з «раннього жовтого тіла» та «фолікулярного росту». Найвищий вміст протеїнів з молекулярною масою 14,4 – 21,5 кДа встановлено в

культури з яєчника «свіжої овуляції» ($23,6 \pm 1,80$ %), нижчий на 5,4 - 5,7 % ($p < 0,05$) з «раннього» та «пізнього жовтого тіла» і на 14,2 % ($p < 0,001$) менший з «фолікулярного росту» ($9,4 \pm 1,10$ %). За культивування клітин з яєчників «свіжої овуляції» та «раннього жовтого тіла» вміст протеїнів з ММ 14,4 кДа однаковий (3,0 %), вищий на 0,7 % з «фолікулярного росту» і низький ($1,8 \pm 0,28$ %) з «пізнього жовтого тіла». Різниця між мінімальним та максимальним значеннями 1,9 % ($p < 0,001$). Вміст протеїнів менше 14,4 кДа у культурі клітин з яєчника «фолікулярного росту» найвищий ($5,8 \pm 1,02$ %), менший на 1,3 % з «пізнього жовтого тіла», ще на 2,8 % ($p < 0,05$) нижчий зі «свіжої овуляції» і найменший ($2,4 \pm 0,21$ %; $p < 0,01$) з «раннього жовтого тіла». Таким чином, для культури гранульози, отриманої з яєчника «фолікулярного росту», порівняно з клітинами з інших фізіологічних станів статевих залоз, характерний вірогідно вищий вміст протеїнів більше 66,2, 31,0 і менше 14,4 кДа.

Крім залежності вмісту протеїнів у культурі клітин від фізіологічного стану яєчника, встановлено відмінності їх значень у зв'язку з розміром фолікула з яких вилученна гранульоза. Зокрема, у зоні з ММ більше 94,6 кДа високі значення характерні для культури з фолікулів більше 7 мм і менше 4 мм, відповідно, яєчників «свіжої овуляції» і «фолікулярного росту», менші на 1,8 - 3,1 % для клітин з великих фолікулів інших фізіологічних станів, а найнижчі величини (5,0 %) з середнього і малого статевих залоз «раннього» та «пізнього жовтих тіл» (табл. 3.20). Різниця між мінімальною і максимальною величинами значень - 4,3 % ($p < 0,05$). Високий вміст протеїнів з ММ 94,6 кДа у клітин, отриманих з фолікула більше 7 мм яєчника «фолікулярного росту» ($8,8 \pm 1,90$ %), на 0,3 - 4,4 % ($p < 0,05$) менше з фолікулів до 7 мм (не залежно від фізіологічного стану статевої залози), а мінімальний ($3,8 \pm 1,00$ %) з більше 7,0 мм «раннього жовтого тіла», що нижче максимуму на 5,0 % ($p < 0,05$). У культурі гранульози з малих фолікулів яєчників «свіжої овуляції», «раннього і пізнього жовтого тіла» вміст протеїнів з ММ 66,2 – 94,6 кДа понижений (4,7 - 7,0 %) і на 3,0 - 5,3 % ($p < 0,01$) вищий з «фолікулярного росту». За вилучення

Вміст протеїнів з ММ більше 45 кДа в культурі клітин гранульози залежно від розміру фолікулів та фізіологічного стану яєчника, %; М±m

Зони, кДа	Фолі кул, мм	Вміст білків за фізіологічного стану яєчника			
		«свіжа овуляція», n = 27	«раннє жовте тіло», n = 32	«пізнє жовте тіло», n = 39	«фолікулярний ріст», n = 88
94,6 >	> 7	9,3±3,90	6,8±1,64	6,2±2,01	7,5±1,03
	4 - 7	4,8±1,07	5,0±1,05	5,7±1,55	8,3±1,16
	4 <	8,0±1,51	5,2±1,33	5,0±0,96*	9,0±1,38
94,6	> 7	5,6±0,90	3,8±1,00*	4,8±2,10	8,8±1,90
	4 - 7	5,1±1,10	8,5±3,50	4,4±0,90*	7,7±1,30
	4 <	4,3±1,00*	7,6±0,70	5,9±1,20	7,8±1,20
94,6 - 66,2	> 7	6,4±1,19	7,6±0,99	5,7±1,21	8,6±1,36
	4 - 7	6,4±1,41	7,7±3,51	11,1±4,29	10,0±2,11
	4 <	4,7±1,14	7,0±1,59	5,1±1,05	10,1±1,45
66,2	> 7	3,9±0,94*	11,8±6,24	7,1±1,21	10,5±1,76
	4 - 7	5,2±1,30	12,4±4,77	10,3±3,28	11,5±2,39
	4 <	4,4±1,00*	13,2±4,21	10,6±3,95	9,4±1,37
66,2 - 45,0	> 7	6,3±1,19	6,2±1,00	11,6±2,54	8,3±1,19
	4 - 7	8,3±0,95	7,1±1,55	7,6±1,06	8,9±1,12
	4 <	5,8±1,09*	6,8±0,70	6,9±1,44	8,9±1,19
45,0	> 7	10,4±1,73	12,4±2,01	9,4±1,83	9,5±1,17
	4 - 7	11,7±2,43	10,1±1,23	10,5±1,61	9,0±1,21
	4 <	12,0±1,82	8,9±1,48	10,5±1,32	10,0±1,27

і культивування клітин з більших розмірів фолікулів вміст вказаної зони протеїнів від 5,7 до 11,1 %, різниця - 5,4 % (p > 0,05). В зоні альбуміну (66,2 кДа) найвищі величини значень, не залежно від розміру фолікулів, встановлено у гранульозі з фолікулів «раннього жовтого тіла» (11,8 - 13,2 %), приблизно такий ж вміст з «фолікулярного росту» (9,4 – 11,5 %) і «пізнього

жовтого тіла» (7,1 – 10,6 %), а найнижчі (3,9 - 5,2 %) з фолікулів «свіжої овуляції», різниця 6,6 - 9,9 % ($p < 0,05$). У зоні протеїнів з ММ 45,0 – 66,2 кДа низький вміст ($5,8 \pm 1,09$ %) у клітин з малого фолікула яєчника «свіжої овуляції», вищий (6,8 - 8,9 %) з менше 7 мм (не залежно від фізіологічного стану яєчника) і найвищий ($11,6 \pm 2,54$ %) з великого фолікула «пізнього жовтого тіла». Різниця між мінімальним і максимальним значеннями 5,8 % ($p < 0,05$). Вміст протеїнів з ММ 45,0 кДа в культурі клітин, не залежно з якого розміру фолікула вони вилучені, не відрізняється: величина значень від 8,9 до 12,4 %, різниця 3,5 % знаходиться в межах середнього арифметичного.

Дослідження вмісту протеїнів з ММ 31,0 – 45,0 кДа встановлено найвищі значення (7,3 - 7,8 %) з яєчників «фолікулярного росту», незалежно від розміру фолікула та розміром менше 7 мм зі «свіжої овуляції» (табл. 3.21). Нижчі величини 6,7 - 6,9 % характерні для культури клітин з фолікулів менше 7 мм і 4 - 7 мм, відповідно, яєчників «раннього» та «пізнього жовтого тіла». Низький вміст протеїнів вказаної зони (5,1 - 5,4 %) проявляється в гранульозі з великих фолікулів статевих залоз «свіжої овуляції», «раннього» і «пізнього жовтого тіла». Різниця між мінімальним і максимальним значеннями 2,7 %. Для культури клітин з фолікула більше 7 мм яєчника фізіологічного стану «раннього жовтого тіла» вміст протеїнів з ММ 31,0 кДа високий ($8,5 \pm 2,70$ %), на 0,9 - 1,5 % нижчий, не залежно від розміру фолікулів, з «фолікулярного росту», а з фолікулів 4 - 7 мм статевої залози «свіжої овуляції» найнижчий ($2,6 \pm 0,56$ %). Різниця між мінімальною і максимальною величинами значень - 5,9 % ($p < 0,05$). У зоні протеїнів ММ 21,5 – 31,0 кДа найвища величина значення ($9,6 \pm 2,90$ %) проявляється у гранульозі з фолікула менше 4 мм яєчника «свіжої овуляції», нижчий на 1,5 - 2,2 % з середнього та великого фолікулів, відповідно, «свіжої овуляції» і «пізнього жовтого тіла» і ще менше у фолікулі менше 4 мм яєчника «фолікулярного росту» - $4,1 \pm 0,56$ %, різниця 5,5 % ($p > 0,05$). У гранульозі з фолікулів менше 7 мм статевої залози «фолікулярного росту» вмістом протеїнів ММ 21,5 кДа низький (7,0 - 7,3 %), вищий (10,3 - 11,4 %) з яєчника «свіжої овуляції», а найвищий ($11,8 \pm 1,80$ %) з

Вміст протеїнів з ММ менше 45 кДа у культурі клітин гранульози залежно від розміру фолікулів та фізіологічного стану яєчника, %; М±m

Зони, кДа	Фолі кул, мм	Вміст протеїнів за фізіологічного стану яєчника			
		«свіжа овуляція», n = 27	«раннє жовте тіло», n = 32	«пізнє жовте тіло», n = 39	«фолікулярний ріст», n = 88
45,0 –	> 7	5,4±0,64	5,2±9,10	5,1±0,70	7,8±1,36
	4 - 7	7,8±1,20	6,7±0,69	6,9±1,48	7,3±0,77
31,0	4 <	7,1±1,26	6,7±0,95	5,4±0,60	7,7±1,31
31,0	> 7	5,5±0,99	8,5±2,70	5,0±0,50	7,0±0,90
	4 - 7	2,6±0,56*	6,1±0,50	5,5±1,10	7,0±1,10
	4 <	6,8±0,60	5,9±0,80	6,3±0,90	7,6±1,30
31,0 –	> 7	6,4±0,13	5,3±0,84	7,4±0,18	4,4±0,52
	4 - 7	8,1±1,90	5,4±0,73	4,7±0,70	4,2±0,58
21,5	4 <	9,6±2,90	5,2±0,47	4,6±0,70	4,1±0,56*
21,5	> 7	11,4±2,30	9,70±2,70	11,8±1,80	8,3±1,40
	4 - 7	10,3±0,90	8,7±1,30	10,7±2,40	7,3±1,20*
	4 <	10,6±0,90	8,2±0,90	9,2±1,30	7,0±1,10*
21,5 - 14,4	> 7	24,4±3,30	17,3±2,70	20,6±3,90	10,4±1,40****
	4 - 7	23,8±3,50	17,7±2,50	17,2±3,30	9,0±1,60****
	4 <	22,4±1,90	18,6±3,10	16,0±3,00	8,7±1,60****
14,4	> 7	2,6±0,47**	2,8±0,51**	2,6±0,78*	3,7±0,38*
	4 - 7	2,5±0,71**	2,6±0,75**	2,1±0,25**	3,7±0,48*
	4 <	2,6±0,47**	3,7±0,68*	7,4±1,70	3,7±0,42*
14,4<	> 7	2,4±0,22	2,6±0,50	2,8±0,64	5,2±1,39
	4 - 7	3,4±2,50	2,0±0,28	3,3±0,95	6,1±2,20
	4 <	1,7±0,15	3,0±0,53	7,1±3,60	6,0±2,18

фолікула більше 7 мм «пізнього жовтого тіла». Різниця між максимальною і мінімальною величинами значень 4,5- 4,8 % (p < 0,05). Незалежно від розміру

фолікулів вміст протеїнів з ММ 14,4 – 21,5 кДа високий (22,4 - 24,4 %) у гранульозі з яєчника «свіжої овуляції», на 3,8 - 7,1 % нижчий з «раннього жовтого тіла» і найменший (8,7 - 10,4 %) з «фолікулярного росту». Різниця між мінімальним і максимальним значеннями - 15,7 % ($p < 0,001$). Максимальна величина ($7,4 \pm 1,70$ %) протеїнів з ММ 14,4 кДа встановлена у гранульозі з фолікула менше 4 мм яєчника «пізнього жовтого тіла», однакова (3,7 %), незалежно від розміру фолікула, з «фолікулярного росту», а найнижча ($2,1 \pm 0,25$ %) з середнього фолікула «пізнього жовтого тіла». Різниця між мінімальним і максимальним значеннями - 5,3 % ($p < 0,01$). Слід зауважити, що різниця між максимальним та іншими величинами значень встановленими в культурі клітин гранульози з різних за розміром фолікулів і фізіологічних станів яєчників статистично вірогідна ($p < 0,05 - 0,01$). Подібні особливості встановлені при вивченні протеїнів з ММ менше 14,4 кДа, максимальна величина значення яких ($7,1 \pm 3,60$ %) виявлена у гранульозі з фолікулів менше 4 мм «пізнього жовтого тіла», однакова (5,2 - 6,1 %) з «фолікулярного росту» і найнижча ($1,7 \pm 0,15$ %) з малого фолікула яєчника «свіжої овуляції». Різниця між мінімальним і максимальним значеннями становить - 5,4 %.

Результати досліджень підрозділу опубліковані у статті [305].

3.5. Концентрація гормонів в культурі клітин гранульози

Доведено, що клітини гранульозного шару фолікулів корів здатні, у відповідь на дію гонадотропних гормонів, утворювати тестостерон, естрадіол і прогестерон [17]. Тому, вивчали особливості синтезу статевих гормонів гранульозою залежно від фізіологічного стану яєчників і розміру фолікулів з яких отримані клітини.

Встановлено, що за культивування найбільше тестостерону ($3,7 \pm 0,37$ моль/л) утворюють клітин гранульози з фолікулів яєчника

«фолікулярного росту» і менше (1,2 - 1,5 нмоль/л; $p < 0,01 - 0,001$) з інших фізіологічних станів статевих залоз (табл. 3.22). Таким чином, за культивування

Таблиця 3.22

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

Фізіологічний стан яєчника	Концентрація гормонів					
	n	Тестостерон	n	Естрадіол	n	Прогестерон
«свіжа овуляція»	9	1,2±0,37 ^{***}	13	10,3±2,90	13	31,2±9,86
«раннє жовте тіло»	15	1,5±0,66 ^{**}	41	8,3±1,50	41	32,3±5,17 [*]
«пізнє жовте тіло»	16	1,3±0,56 ^{***}	32	5,8±0,90 ^{**}	27	53,2±8,85
«фолікулярний ріст»	51	3,7±0,37	84	9,6±0,90	81	36,9±3,86

найвищою здатністю утворювати тестостерон характеризуються клітини гранульозного шару з фолікулів яєчника «фолікулярного росту».

При оцінюванні концентрації естрадіолу встановлена висока величина показника в гранульозі з фолікулів яєчників «фолікулярного росту» і «свіжої овуляції» (9,6 - 10,3 нмоль/л), нижча на 15,6 % з «раннього жовтого тіла», а найменша (5,8±0,90 нмоль/л) з «пізнього жовтого тіла». Різниця між максимальними і мінімальним значеннями - 39,6 - 43,7 % ($p < 0,01$). Отже, найвища інтенсивність утворення естрадіолу проявляється у клітин гранульози з яєчників «фолікулярного росту» і «свіжої овуляції».

Концентрація прогестерону максимально висока у культурі клітин з фолікулів яєчника «пізнього жовтого тіла» (53,2±8,85 нмоль/л), нижча на 39,3 - 41,4 % ($p < 0,05$) з «раннього жовтого тіла» і «свіжої овуляції» і на 30,6 % «фолікулярного росту». Отже, максимальною здатністю утворювати прогестерон характеризуються клітини гранульози з фолікулів статевих залоз «пізнього жовтого тіла».

Крім впливу фізіологічного стану яєчника, концентрація гормонів у культурі клітин залежить ще й від розміру фолікула. Зокрема, концентрація тестостерону найвища у гранульозі з фолікула більше 7 мм яєчника

«фолікулярного росту» ($4,6 \pm 0,63$ нмоль/л), нижча на 17,4 % з малого і найнижча ($2,8 \pm 1,14$ нмоль/л) з середнього (табл. 3.23). У клітинах з фолікулів

Таблиця 3.23

Концентрація гормонів у культурі гранульози залежно від розміру фолікула, нмоль/л; $M \pm m$

Стан яєчника	Розмір, мм	Концентрація гормонів					
		n	Тестостерон	n	Естрадіол	n	Прогестерон
«свіжа овуляція»	> 7	3	$1,4 \pm 0,13$	3	$14,7 \pm 4,80$	3	$38,5 \pm 18,27$
	4-7	3	$1,2 \pm 0,37$	6	$6,2 \pm 1,90$	6	$42,8 \pm 14,51$
	4 <	3	$1,2 \pm 0,18$	4	$11,9 \pm 6,70$	4	$6,5 \pm 1,89^*$
«раннє жовте тіло»	> 7	5	$1,3 \pm 0,72$	14	$7,9 \pm 2,80$	14	$53,1 \pm 10,81$
	4-7	4	$1,8 \pm 1,15$	8	$7,6 \pm 2,60$	8	$21,3 \pm 6,92^*$
	4 <	6	$1,4 \pm 1,22$	19	$9,4 \pm 2,90$	19	$22,5 \pm 6,89^*$
«пізнє жовте тіло»	> 7	10	$0,4 \pm 0,05$	14	$4,5 \pm 0,90$	10	$71,7 \pm 13,09$
	4-7	3	$2,6 \pm 1,68$	9	$8,4 \pm 1,90$	9	$46,4 \pm 14,66$
	4 <	3	$2,9 \pm 1,62$	9	$4,3 \pm 0,90$	8	$42,4 \pm 15,55$
«фолікулярний ріст»	> 7	25	$4,6 \pm 0,63$	36	$11,9 \pm 1,70$	31	$15,6 \pm 7,97$
	4-7	10	$2,8 \pm 1,14$	20	$8,1 \pm 2,00$	22	$33,9 \pm 8,80$
	4 <	16	$3,8 \pm 0,51$	28	$9,2 \pm 1,30$	28	$37,9 \pm 5,52^*$

менше 7 мм «пізнє жовте тіло» величина показника майже однакова ($2,6 - 2,9$ нмоль/л) і на 84,7 - 86,3 % нижча з великого. У гранульозі з «раннє жовте тіло», не залежно від розміру фолікула, концентрація тестостерону в межах 1,3 - 1,8 нмоль/л, різниця становить 0,4 - 0,5 нмоль/л ($p > 0,05$). Аналогічно, в культурі клітин з яєчника «свіжої овуляції», не залежно від величини фолікула, величина показника в межах 1,2 - 1,4 нмоль/л. Отже, максимальними за продукцією тестостерону є клітини гранульози отримані з великого фолікула яєчника «фолікулярного росту».

Утворення естрадіолу клітинами також залежить від розміру фолікула і фізіологічного стану яєчника. Висока інтенсивність синтезу гормону в

гранульозі з великих та малих фолікулів яєчників «фолікулярного росту» і «свіжої овуляції» (9,2 - 14,7 нмоль/л), що вище на 13,5 - 57,9 % ніж у середніх. За «пізнього жовтого тіла» клітини, отримані з малих і великих фолікулів утворювали 4,3 - 4,5 нмоль/л естрадіолу, а з середнього на 46,5 - 48,9 % більше (8,4±1,90 нмоль/л). Гранульоза, культивована з малого фолікула яєчника «раннього жовтого тіла», проявляє тенденцію до інтенсивнішого синтезу естрадіолу (9,4±2,90 нмоль/л), порівняно з клітинами отриманими з більших фолікулів (7,9 - 7,9 нмоль/л). Таким чином, клітини гранульози, з великих і малих фолікулів яєчників «фолікулярного росту» і «свіжої овуляції», за культивування синтезують максимально високу концентрацію естрадіолу.

Висока концентрація прогестерону виявлена у культурі клітин з великого фолікула «пізнього жовтого тіла» (71,7±13,09 нмоль/л), а з менших на 35,3 - 40,9 % нижча. Для клітин з фолікулів менше 7 мм яєчника «фолікулярного росту» здатність продукувати прогестерон на 48,9 - 54,0 % вища, ніж з великого ($p < 0,05$). На противагу, гранульоза отримана з фолікулів менше 7 мм статеві залози «раннього жовтого тіла» характеризується на 57,7 - 59,9 % ($p < 0,05$) нижчою здатністю синтезувати прогестерон, ніж з великого. Клітини, які отримані з фолікулів більше 7 мм яєчника «свіжої овуляції» синтезують в 5,9 - 6,9 разів ($p < 0,05$) більше прогестерону, ніж з малого фолікула. Таким чином, максимально високим синтезом прогестерону характеризується гранульоза з великого фолікула яєчника «пізнього жовтого тіла».

3.6. Кореляції між інтенсивністю окисних процесів, вмістом протеїнів та утворенням гормонів клітинами гранульози фолікулів яєчників корів

Оскільки клітини гранульози характеризуються, крім особливостей використання субстратів і активністю окремих ланок окисного метаболізму, здатністю утворювати гормони, вивчали кореляції між біохімічними показниками та інтенсивністю синтезу естрогенів.

Зокрема виявлено, що з підвищенням дихальної активності з менше 1,0 до 3,0 нг-атом О/хв×0,1 мл СК концентрація тестостерону зростає на 94,8 % ($p < 0,05$) та прогестерону на 49,1 % ($p < 0,05$; табл. 3.24). Концентрація естрадіолу

Таблиця 3.24

Зв'язок між дихальною активністю та відновною здатністю й інтенсивністю синтезу статевих гормонів клітинами гранульози

Класи варіаційного ряду	Концентрація гормонів, нмоль/л					
	Тестостерон		Естрадіол		Прогестерон	
	n	M±m	n	M±m	n	M±m
Дихальна активність, нг-атом О/хв×0,1 мл СК						
> 4,0	15	4,6±0,88	55	6,3±1,00	53	34,0±5,65 ^{***}
3,1 - 4,0	3	4,5±1,09	18	10,3±2,00	18	71,8±9,66
2,1 - 3,0	9	3,8±1,49	14	8,7±2,00	15	48,3±8,31
1,0 - 2,0	7	0,6±0,15	9	8,6±3,70	10	51,7±11,43
1,0 <	4	0,2±0,07 [*]	5	6,5±3,20	5	24,6±2,60 [*]
η	0,472		0,203		0,368	
Відновна здатність без акцептора, К ₃ .../хв×0,1 мл СК						
> 4,5	7	0,7±0,16 ^{**}	14	4,3±1,20 [*]	14	42,1±10,88
3,1 - 4,5	15	0,9±0,51 ^{**}	48	4,0±0,70 ^{**}	50	36,6±5,40
1,5 - 3,0	2	0,6±0,36 ^{**}	7	15,0±3,90	7	29,9±10,98
1,50 <	9	4,1±0,85	18	9,5±2,40	17	41,9±11,08
η	0,619		0,466		0,091	

за вказаних умов майже не змінюється і знаходиться в межах 6,5 - 8,7 нмоль/л. Підвищення дихальної активності клітин до 4,0 нг-атом О/хв×0,1 мл СК супроводжується ще збільшенням концентрації гормонів: тестостерону до 4,5±1,09, естрадіолу - 10,3±2,00 і прогестерону - 71,8±9,66 нмоль/л. За найвищої дихальної активності (більше 4,0 нг-атом О/хв×0,1 мл СК) концентрація тестостерону (4,6±0,88 нмоль/л) не змінюється, а естрадіолу і прогестерону - знижуються, порівняно з максимальними значеннями, відповідно, на 38,9 і 52,7

% ($p < 0,001$). Таким чином, існує оптимальна величина дихальної активності клітин гранульози (3 - 4 нг-атом О/хв \times 0,1 мл СК) за якої проявляється максимально висока здатність культури синтезувати статеві гормони. Кореляційне відношення за дихальною активністю для концентрації тестостерону позитивне середньої сили ($\eta = 0,472$), естрадіолу і прогестерону - криволінійне, відповідно, слабке ($\eta = 0,203$) і середньої сили ($\eta = 0,368$).

Оцінювання залежності між відновною здатністю й утворенням статевих гормонів клітинами гранульози свідчить, що до 1,5 К₃.../хв \times 0,1 мл СК концентрація тестостерону максимальна ($4,1 \pm 0,85$ нмоль/л), а за збільшення позаклітинного транспорту електронів знижується. Кореляційне відношення між відновною здатністю (без акцептора електронів) та концентрацією тестостерону в культурі клітин середньої сили ($\eta = 0,619$). Від відновної здатності гранульози залежить й концентрація естрадіолу, максимальна величина якого ($15,0 \pm 3,90$ нмоль/л) проявляється за 1,5 - 3,0 К₃.../хв \times 0,1 мл СК, а нижча ($4,0 - 4,3$ нмоль/л) за 3,0 і більше К₃.../хв \times 0,1 мл СК. Різниця між низьким і високим значеннями - 73,4 % ($p < 0,01$). Кореляційне відношення між відновною здатністю (без акцептора електронів) й концентрацією естрадіолу криволінійне середньої сили ($\eta = 0,466$). Оцінюванням залежності концентрації прогестерону від інтенсивності позаклітинного транспорту електронів виявлено слабку силу кореляції ($\eta = 0,091$).

Додавання К₃[Fe(CN)₆] до середовища визначення зумовлює перерозподіл потоку електронів з ланцюга дихання мітохондрій й цитозолу клітин, що характеризується зниженням утворенням тестостерону і естрадіолу та підвищенням - прогестерону. Так, за менше 1,0 нг-атом О/хв \times 0,1 мл СК концентрації тестостерону і естрадіолу високі, відповідно, $0,8 \pm 0,36$ і $10,8 \pm 3,10$ нмоль/л, а прогестерону, навпаки, низька - $32,3 \pm 12,29$ нмоль/л (табл. 3.25). Зростання дихальної активності до 3,0 нг-атом О/хв \times 0,1 мл СК знижує на 62,5 % концентрації тестостерону і на 13,0 % естрадіолу та на 27,2 % підвищує прогестерону. За максимальної дихальної активності на фоні доданого акцептора концентрація тестостерону не змінюється ($0,3 \pm 0,13$ нмоль/л),

Зв'язок дихальної активності й відновної здатності за доданого акцептора електронів та стероїдогенезом клітин гранульози

Класи варіаційного ряду	Концентрація гормонів, нмоль/л					
	Тестостерон		Естрадіол		Прогестерон	
	n	M±m	n	M±m	n	M±m
Споживання кисню з акцептором електронів нг-атом O/хв×0,1 мл СК						
> 3,0	6	0,3±0,13	10	3,5±0,90*	10	52,9±12,12
2,1 - 3,0	4	0,3±0,05	8	9,4±2,90	8	41,1±10,06
1,0 - 2,0	12	0,6±0,16	16	10,6±2,70	16	39,7±8,54
1,0 <	4	0,8±0,36	6	10,8±3,10	6	32,3±12,29
η	0,394		0,348		0,202	
Відновна здатність з акцептором, К ₃ .../хв×0,1 мл СК						
> 4,5	12	0,5±0,16	18	6,8±1,10	18	55,3±8,98
3,1 - 4,5	5	0,7±0,15	10	11,8±3,50	10	25,2±7,88*
1,5 - 3,0	6	0,3±0,08	7	3,3±0,80*	7	36,0±9,08
1,5 <	3	1,0±0,44	6	14,3±4,70	6	32,3±12,60
η	0,401		0,429		0,385	

естрадіолу ще на 62,8 % знижується, а прогестерону на 28,7 % підвищується. Кореляційне відношення за дихальною активністю з акцептором електронів і концентрацією тестостерону та естрадіолу негативне середньої сили (відповідно, $\eta = 0,394$ і $0,348$), а прогестерону - слабок ($\eta = 0,202$). Отже, відтік електронів з мітохондрій і цитозолу клітин за культивування призводить до порушення утворення статевих гормонів культурою гранульози.

Відновна здатність гранульози з акцептором електронів проявляє неоднозначний зв'язок з інтенсивністю стероїдогенезу клітин. Так, за менше 1,5 К₃.../хв×0,1 мл СК концентрація тестостерону максимальна (1,0±0,44 нмоль/л), за підвищення до 4,5 К₃.../хв×0,1 мл СК на 30 % знижується і при більше 4,5 К₃.../хв×0,1 мл СК становить 0,5±0,16 нмоль/л. Кореляційне відношення за відновною здатністю гранульози у присутності позаклітинного

акцептора для тестостерону середньої сили ($\eta = 0,401$). Концентрація естрадіолу висока ($14,3 \pm 4,70$ нмоль/л) за відновної здатності гранульози менше $1,5 \text{ К}_3 \dots / \text{хв} \times 0,1$ мл СК, знижується на 77,0 % ($p < 0,05$) при збільшенні до $3,0 \text{ К}_3 \dots / \text{хв} \times 0,1$ мл СК і знову підвищується на 51,5 % за більше $4,5 \text{ К}_3 \dots / \text{хв} \times 0,1$ мл СК. Кореляційне відношення за відновною здатністю клітин гранульози у присутності $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ для естрадіолу середньої сили ($\eta = 0,429$). За зростання відновної здатності клітин у присутності ферриціаніду калію підвищується утворення прогестерону в культурі гранульози. Так, за менше $1,5 \text{ К}_3 \dots / \text{хв} \times 0,1$ мл СК концентрація гормону - $32,3 \pm 12,60$ нмоль/л, за збільшення до $4,5 \text{ К}_3 \dots / \text{хв} \times 0,1$ мл СК на 22,0 % знижується, а за більше $4,5 \text{ К}_3 \dots / \text{хв} \times 0,1$ мл СК зростає до $55,3 \pm 8,98$ нмоль/л. Різниця між мінімальним і максимальним значеннями становить 54,5 % та статистично вірогідна ($p < 0,05$). Кореляційне відношення за відновною здатністю гранульози у присутності позаклітинного акцептора для прогестерону середньої сили ($\eta = 0,385$).

Оскільки клітини гранульози ресинтезують АТФ шляхом аеробного окиснення цукрів, аналізували зв'язки між активністю і вмістом ізоцимів ЛДГ та інтенсивністю синтезу статевих гормонів. Виявлено, що з підвищенням активності ЛДГ від менше 1,0 до 2,0 мкМ/хв×мг протеїну концентрація тестостерону знижується на 50,0 %, а естрадіолу і прогестерону підвищується, відповідно, на 42,1 і 22,6 % (табл. 3.26). За максимальної активності

Таблиця 3.26

Зв'язок активності ЛДГ зі стероїдогенезом культури клітин

Активність ЛДГ, мкМ / хв×мг протеїну	Концентрація гормонів, нмоль/л					
	Тестостерон		Естрадіол		Прогестерон	
	n	M±m	n	M±m	n	M±m
> 3,0	3	3,3±2,53	3	11,1±3,20	3	96,0±2,45
2,1 – 3,0	7	2,2±0,91	8	6,2±1,70	8	56,5±15,04*
1,0 – 2,0	3	2,6±1,86	3	12,1±5,40	3	70,3±23,41
1,0 <	4	5,2±1,08	8	7,0±2,30	8	54,4±15,81*
η	0,378		0,339		0,331	

(більше 3,0 мкМ/хв×мг протеїну) концентрація тестостерону - $3,3 \pm 2,53$, естрадіолу - $11,1 \pm 3,20$, а прогестерону - $96,0 \pm 2,45$ нмоль/л, різниця між вказаними і вихідними величинами, відповідно, 36,5, 36,9 і 43,3 % ($p < 0,05$). Кореляційне відношення за активністю ЛДГ для концентрації тестостерону, естрадіолу і прогестерону середньої сили ($\eta = 0,331 - 0,378$).

Одночасно інтенсивність утворення гормонів залежить від вмісту ізоимів ЛДГ. За вмісту ЛДГ1 менше 10 % високі концентрації тестостерону - $7,9 \pm 0,65$, естрадіолу - $13,8 \pm 4,30$, і прогестерону $77,0 \pm 19,05$ нмоль/л (табл. 3.27). При збільшенні вмісту ЛДГ1 до 20 % концентрація гормонів знижується, відповідно, на 79,7 ($p < 0,001$), 63,0 і 26,4 %. При величині більше 30 % ізоиму концентрації тестостерону та естрадіолу майже не змінюються і знаходяться в межах 2,4 - 2,9 і 6,3 - 7,5 нмоль/л, а прогестерону на 61,7 % знижується до $29,5 \pm 9,98$ нмоль/л ($p < 0,05$). Кореляційне відношення між вмістом ЛДГ1 а концентрацією тестостерону і прогестерону негативне середньої сили ($\eta = 0,635$ і $0,335$), а естрадіолу слабке ($\eta = 0,284$).

Аналіз зв'язку ЛДГ2 з гормонами у культурі клітин гранульози свідчить, що при збільшенні вмісту від 1,0 до 2,0 % і більше ізоиму концентрація тестостерону збільшується з $0,7 \pm 0,44$ нмоль/л на 82,0 % ($p < 0,05$), а естрадіолу знижується з $9,8 \pm 3,90$ нмоль/л на 44,8 %. Концентрація прогестерону майже однакова (50,0 - 67,7 нмоль/л) за низького (менше 1,0 %) і високого (більше 2,0 %) вмісту ЛДГ2 і нижча на 36,4 - 55,9 % при 1,0 – 2,0 % ізоиму. Кореляційне відношення за вмістом ЛДГ2 для тестостерону і прогестерону середньої сили ($\eta = 0,319 - 0,329$), а естрадіолу - слабке ($\eta = 0,219$).

За вмісту ЛДГ3 менше 10,0 % концентрації тестостерону та естрадіолу високі, відповідно, $8,8 \pm 0,49$ і $9,0 \pm 3,20$ нмоль/л, за збільшення до 20,0 % знижуються на 59,1 і 11,2 % і за більше 25,0 % нижчі на 70,5 і 50,0 %, порівняно з вихідними значеннями. Концентрація прогестерону низька ($22,3 \pm 10,88$ нмоль/л) за 10,0 – 15,0 % ЛДГ3, а за інших величин ізоиму в межах 46,9 - 59,7 нмоль/л. Кореляційне відношення за вмістом ЛДГ3 для концентрації тестостерону негативне середньої сили ($\eta = 0,600$), прогестерону криволінійне

Зв'язок вмісту ізозимів ЛДГ з концентрацією гормонів, нмоль/л

Класи варіаційного ряду		Тестостерон		Естрадіол		Прогестерон	
		n	M±m	n	M±m	n	M±m
ЛДГ1, %	> 30,0	4	2,9±1,53*	17	7,5±2,60	17	29,5±9,98*
	20,1- 30,0	6	2,4±1,10**	14	6,3±1,70	14	42,5±12,21
	10,0 – 20,0	8	1,6±0,87***	13	5,1±1,20	12	56,7±13,30
	10,0 <	3	7,9±0,65	4	13,8±4,30	4	77,0±19,05
	η	0,635		0,284		0,335	
ЛДГ2, %	> 2,0	8	3,9±1,36	16	5,4±1,30	16	50,0±11,60
	1,6 – 2,0	5	2,7±1,43	13	6,0±1,30	12	29,8±12,12
	1,0 - 1,5	3	0,7±0,44*	10	9,8±3,90	10	31,8±11,20
	1,0 <	5	3,1±1,09	9	8,3±2,90	9	67,7±14,80
	η	0,319		0,219		0,329	
ЛДГ3, %	> 25,0	6	2,6±1,01***	13	4,5±1,10	13	46,9±12,44
	20,1 - 25,0	3	1,8±1,10***	7	6,7±2,70	6	59,7±16,92
	15,1 - 20,0	8	2,1±1,03***	12	8,3±2,00	12	53,3±13,99
	10,0 - 15,0	3	3,6±2,55	12	8,0±3,70	12	22,3±10,88
	10,0 <	3	8,8±0,49	4	9,0±3,20	4	52,7±23,13
	η	0,600		0,210		0,313	
ЛДГ4, %	> 20,0	4	2,7±1,98	13	5,1±1,50	13	37,9±12,25
	15,1- 20,0	4	3,1±1,50	8	8,4±2,00	8	51,8±16,72
	10,0 - 15,0	6	3,5±1,34	11	5,6±1,40	10	54,8±14,03
	10,0 <	7	2,6±1,08	16	8,8±3,10	16	39,4±10,78
	η	0,110		0,211		0,168	
ЛДГ5, %	> 20,0	8	3,5±1,18	16	10,3±3,10	15	52,3±12,07
	15,1- 20,0	5	1,9±1,17	13	6,1±0,90	13	42,6±13,44
	10,0 – 15,0	3	3,0±1,77	9	3,6±1,30	9	30,8±12,30
	10,0 <	5	3,2±1,59	10	5,9±1,70	10	46,9±13,49
	η	0,193		0,318		0,176	

середньої сили ($\eta = 0,313$) і естрадіолу слабке ($\eta = 0,210$).

Вміст ЛДГ4 зі слабкою силою впливає на утворення гормонів клітинами:

величини значень тестостерону, естрадіолу і прогестерону незалежно від зміни вмісту ізозиму в класах варіаційного ряду становили, відповідно, 2,6 - 3,5, 5,1 - 8,8 і 37,9 - 54,8 нмоль/л, різниця між величинами значень в межах похибки середнього арифметичного. Кореляційне відношення за вмістом ЛДГ4 для концентрації гормонів в культурі клітин слабе ($\eta = 0,110 - 0,211$).

За вмісту від менше 10,0 до 20,0 % ЛДГ5 концентрація естрадіолу 3,6 - 6,1 нмоль/л, а при більше 20,0 % зростає на 40,7 - 65,0 %. Концентрація тестостерону і прогестерону слабо залежить від ЛДГ5: величини значень в межах, відповідно, 1,9 - 3,5 і 30,8 - 52,3 нмоль/л, різниця становить 1,1 - 1,6, та 11,8 - 21,5 нмоль/л, що в межах похибки середнього арифметичного. Кореляційне відношення за вмістом ЛДГ5 для концентрації естрадіолу середньої сили ($\eta = 0,318$), а тестостерону і прогестерону слабе ($\eta = 0,176 - 0,193$).

Концентрація статевих гормонів за культивування гранульози залежить від постачання і використання субстратів в дихальному ланцюзі мітохондрій. Серед ензимів, які характеризують інтенсивність окисного метаболізму є МДГ. Встановлено, що зі зростанням активності ензиму підвищується утворення статевих гормонів. Так, за менше 0,5 мкМ /хв×мг протеїну МДГ низькі концентрації тестостерону ($2,1\pm 0,45$), естрадіолу ($2,6\pm 0,80$) і прогестерону ($20,8\pm 6,28$ нмоль/л; табл. 3.28). Підвищення до 1,5 мкМ/хв×мг протеїну

Таблиця 3.28

Зв'язок активності МДГ з концентрацією гормонів у культурі клітин

Активність МДГ, мкМ / хв×мг протеїну	Концентрація гормонів, нмоль/л					
	Тестостерон		Естрадіол		Прогестерон	
	n	M±m	n	M±m	n	M±m
> 1,5	16	5,6±0,48	22	22,3±1,80	16	42,4±11,70
1,1 - 1,5	9	6,4±1,21	22	7,2±1,80***	20	34,0±10,30
0,5 – 1,0	9	0,4±0,02***	26	2,7±0,40***	26	33,7±8,89
0,5 <	26	2,1±0,45***	28	2,6±0,80***	28	20,8±6,28
η	0,700		0,802		0,188	

призводить до зростання утворення гормонів, відповідно, на 67,2 ($p < 0,001$), 63,9 ($p < 0,05$) і 38,8 %. За більше 1,5 мкМ/хв×мг протеїну ензиму концентрація тестостерону не змінюється ($5,6 \pm 0,48$ нмоль/л), а естрадіолу і прогестерону ще зростає на 67,7 % ($p < 0,001$) і 19,8 %. Кореляційне відношення за активністю МДГ для концентрації тестостерону і естрадіолу позитивне сильне (відповідно, $\eta = 0,700$ і $0,802$), а прогестерону - слабке ($\eta = 0,188$).

Поряд з впливом активності МДГ, утворення гормонів залежить від окремих ізозимів ензиму. Зокрема, за менше 15 % МДГ1 концентрація гормонів низька (тестостерону - $0,3 \pm 0,06$, естрадіолу - $4,0 \pm 0,60$ і прогестерону - $24,9 \pm 5,31$ нмоль/л; табл. 3.29). За збільшення до 30 % МДГ1 концентрації тестостерону і естрадіолу підвищуються, відповідно, на 91,9 ($p < 0,05$) і 69,9 % ($p < 0,01$), а прогестерону не змінюється ($18,8 \pm 5,57$ нмоль/л). За більше 30 % ізозиму концентрації тестостерону і естрадіолу майже не змінюються (відповідно, $4,0 \pm 0,55$ і $11,1 \pm 1,50$ нмоль/л), а прогестерону підвищується на 69,7 % ($p < 0,001$) до $62,0 \pm 6,60$ нмоль/л. Кореляційне відношення за МДГ1 для концентрації гормонів позитивне середньої сили (тестостерону - $\eta = 0,529$, естрадіолу - $\eta = 0,399$ і прогестерону - $\eta = 0,487$).

Концентрація гормонів зі слабкою силою залежить від вмісту МДГ2. При цьому, за менше 10 % ізозиму концентрація тестостерону мінімальна ($2,4 \pm 0,52$ нмоль/л), за збільшення до 20 % МДГ2 зростає на 20,0 % і за більше 20 % найвища - $3,2 \pm 0,86$ нмоль/л. На противагу, концентрація естрадіолу до 20 % МДГ2 майже однакова ($9,0 - 9,7$ нмоль/л) і знижується на 22,7 % при більше 20 % ізозиму. Концентрація прогестерону при зростанні вмісту МДГ2 у варіаційному ряді від мінімального до максимального значень становить $35,1 - 44,6$ нмоль/л, різниця $9,5$ нмоль/л знаходиться в межах похибки середнього арифметичного. Кореляційне відношення за вмісту МДГ2 для концентрації гормонів слабке ($\eta = 0,090 - 0,124$).

За менше 20 % МДГ3 концентрації тестостерону і прогестерону становлять, відповідно, $3,6 \pm 0,56$ і $46,5 \pm 5,94$ нмоль/л, за збільшення до 40 % ізозиму концентрація тестостерону знижується на 66,7 % ($p < 0,001$), а

Зв'язок вмісту ізозимів МДГ з концентрацією гормонів у культурі клітин

Класи варіаційного ряду		Концентрація гормонів, нмоль/л					
		Тестостерон		Естрадіол		Прогестерон	
		n	M±m	n	M±m	n	M±m
МДГ1, %	> 30,0	25	4,0±0,55	34	11,1±1,50	34	62,0±6,60
	15,0 – 30,0	7	3,7±1,47	19	13,3±3,90	19	18,8±5,57***
	15,0 <	11	0,3±0,06***	43	4,0±0,60**	44	24,9±5,31***
	η	0,529		0,399		0,487	
МДГ2, %	> 20,0	17	3,2±0,86	33	7,5±1,30	33	35,1±6,96
	10,0 – 20,0	13	3,0±0,95	24	9,0±2,30	24	44,6±8,85
	10,0 <	27	2,4±0,52	54	9,7±1,60	48	37,8±5,58
	η	0,124		0,096		0,090	
МДГ3, %	> 40,0	7	0,3±0,06***	37	4,3±0,80***	38	30,4±6,27
	20,0 – 40,0	5	1,2±0,34***	19	16,4±3,80	19	32,3±9,69
	20,0 <	33	3,6±0,56	43	8,2±1,10*	43	46,5±5,94
	η	0,440		0,435		0,197	
МДГ4, %	> 20,0	9	1,2±1,02	22	5,1±1,00	22	16,6±4,85***
	10,0 – 20,0	7	3,7±1,48	21	11,8±3,30	21	29,4±8,26
	10,0 <	28	1,6±0,33	56	9,1±1,40	50	44,8±6,28
	η	0,307		0,211		0,298	
МДГ5, %	> 20,0	33	3,5±0,49	51	13,2±1,70	44	52,2±6,12
	10,0 – 20,0	8	4,7±1,39	29	5,6±1,40***	29	22,2±5,97***
	10,0 <	14	0,3±0,05**	29	4,6±0,80***	30	30,0±6,77*
	η	0,522		0,397		0,342	

прогестерону на 30,5 % і при більше 40 % МДГ3 низькі - 0,3±0,06 і 30,4±6,27 нмоль/л. Різниця між мінімальними і максимальними величинами значень становить: тестостерону - 91,7 % (p<0,001), прогестерону - 34,6 %. За

20 - 40 % МДГ3 проявляється максимальна інтенсивність синтезу естрадіолу ($16,4 \pm 3,80$ нмоль/л), а за менше 20 % і більше 40 % - утворення гормону понижене, відповідно, на 50 % ($p < 0,05$) і на 73,8 % ($p < 0,001$). Кореляційне відношення за вмісту МДГ3 для концентрації тестостерону і естрадіолу середньої сили ($\eta = 0,440$ і $0,435$), а прогестерону слабке ($\eta = 0,197$).

Подібний результат отримано при аналізі концентрації гормонів в культурі клітин залежно від вмісту МДГ4. Зокрема, високі концентрації тестостерону ($3,7 \pm 1,48$ нмоль/л) і естрадіолу ($11,8 \pm 3,30$ нмоль/л) виявлено за 10 - 20 % ізозиму, а за мінімального (менше 10 %) і максимального (більше 20 %) нижчі, відповідно, на 56,7 % і 67,6 % та 22,9 % і 56,8 %. При менше 10 % МДГ4 концентрація прогестерону висока ($44,8 \pm 6,28$ нмоль/л), при збільшенні до 20 % ізозиму знижується на 34,4 %, і при більше 20 % становить $16,6 \pm 4,85$ нмоль/л. Різниця між мінімальною і максимальною концентраціями прогестерону - 62,9 % ($p < 0,001$). Кореляційне відношення за вмістом МДГ4 для концентрації тестостерону криволінійне середньої сили ($\eta = 0,307$), а естрадіолу і прогестерону слабке ($\eta = 0,211$ і $0,298$).

За менше 10 % МДГ5 концентрація гормонів у культурі гранульози низька: тестостерону - $0,3 \pm 0,05$, естрадіолу - $4,6 \pm 0,80$ і прогестерону - $30,0 \pm 6,77$ нмоль/л. При збільшенні до 20 % ізозиму концентрації тестостерону і естрадіолу збільшуються на 93,6 % ($p < 0,01$) і 17,8 %, а прогестерону не змінюється ($22,2 \pm 5,97$ нмоль/л). Піввищення більше 20 % МДГ5 не впливає на концентрацію тестостерону ($3,5 \pm 0,49$ нмоль/л), а естрадіолу і прогестерону зростають, відповідно, на 57,6 % ($p < 0,001$) і 57,5 % ($p < 0,001$). Кореляційне відношення за МДГ5 для концентрації гормонів позитивне середньої сили: тестостерону - $\eta = 0,522$, естрадіолу - $\eta = 0,397$ і прогестерону - $\eta = 0,342$.

За існування клітини окиснюють субстрати середовища культивування і ресинтезують АТФ в дихальному ланцюзі мітохондрій. За вказаних метаболічних процесів утворюються АФО, які здатні змінювати і гальмувати стероїдогенез гранульози. Тому, вивчили кореляції між активністю ензимів антиоксидантного захисту і вмістом їх ізозимів, які характеризують

напруженість утворення і розщеплення АФО, й інтенсивністю утворення статевих гормонів клітинами гранульози. Аналіз кореляцій між активністю СОД і концентрацією гормонів у культурі клітин свідчить, що до 10 МО/мг білка концентрації тестостерону, естрадіолу і прогестерону знаходяться в межах, відповідно, 2,5 - 3,7, 8,9 - 8,4 і 55,2 - 59,1 нмоль/л (табл. 3.30). Підвищення більше 10 МО/ мг білка СОД характеризується зростанням

Таблиця 3.30

Зв'язок активності СОД з концентрацією гормонів у культурі гранульози

Активність СОД, МО/ мг білка	Концентрація гормонів, нмоль/л					
	Тестостерон		Естрадіол		Прогестерон	
	n	M±m	n	M±m	n	M±m
> 10,0	4	5,1±1,76	10	12,9±3,00	10	34,6±8,61
5,0 – 10,0	10	2,5±1,02	16	8,9±2,10	16	55,2±11,90
5,0 <	6	3,7±1,15	15	8,4±0,90	15	59,1±11,81
η	0,306		0,247		0,244	

концентрації тестостерону на 27,5 - 51,0 % і естрадіолу - 31,1 - 34,9 % та зниженням прогестерону на 37,4 - 41,5 %. Кореляційне відношення за активністю СОД для концентрації тестостерону середньої сили ($\eta = 0,306$), а естрадіолу та прогестерону слабке ($\eta = 0,244 - 0,247$).

Концентрація гормонів у культурі клітин залежить від ізоцимів СОД. Зокрема, низька концентрація тестостерону ($1,6\pm 1,03$ нмоль/л) встановлена за 10,0 – 15,0 % S1 і вища на 1,7 - 2,5 % за менше 10,0 % та більше 15,0 % ізоциму (табл. 3.31). Концентрація прогестерону 42,7 - 54,2 нмоль/л проявляється за більше 10,0 % S1 і вища на 27,4 - 38,9 % за менше 10,0 % ізоциму. Концентрація естрадіолу не залежить від вмісту S1 і знаходиться в межах 7,2 - 8,3 нмоль/л. Кореляційне відношення за вмістом S1-ізоциму для концентрацій тестостерону і прогестерону, відповідно, $\eta = 0,358$ і $0,346$, а естрадіолу - $\eta = 0,059$.

За менше 10,0 % S2-ізоциму в культурі клітин гранульози концентрація гормонів низька: тестостерону $0,9\pm 0,33$, естрадіолу $4,8\pm 1,50$ і прогестерону

Зв'язок вмісту ізоцимів СОД з концентрацією гормонів

Класи варіаційного ряду		Концентрація гормонів, нмоль/л					
		Тестостерон		Естрадіол		Прогестерон	
		n	M±m	n	M±m	n	M±m
S5, %	> 10,0	7	1,4±0,56*	9	6,3±2,20	9	51,7±14,13
	5,0 – 10,0	3	2,5±1,88	4	9,1±4,70	4	55,8±21,63
	5,0 <	4	5,6±1,54	6	8,7±2,30	6	68,3±17,70
	η	0,593		0,181		0,168	
S4, %	> 40,0	6	0,9±0,31	7	5,5±1,50	7	49,7±16,13
	30,0 – 40,0	5	4,4±1,63	7	10,9±3,80	7	61,4±16,48
	30,0 <	3	4,0±1,60	5	6,0±1,50	5	64,0±19,17
	η	0,536		0,347		0,144	
S3, %	> 20,0	5	2,6±1,56	5	9,6±2,60	5	83,0±14,31
	15,0 – 20,0	4	0,25±0,07***	5	2,5±0,80*	5	28,2±15,93*
	15,0 <	5	5,1±0,85	9	9,3±2,80	9	60,2±14,45
	η	0,629		0,423		0,460	
S2, %	> 20,0	5	5,7±1,38	7	10,5±3,00	7	74,0±14,94
	10,0 – 20,0	4	1,5±0,91*	5	7,5±3,60	5	46,6±19,30
	10,0 <	5	0,9±0,33**	7	4,8±1,50	7	49,6±16,20
	η	0,715		0,343		0,286	
S1, %	> 15,0	4	4,1±1,20	8	7,5±2,30	8	54,2±15,85
	10,0 – 15,0	6	1,6±1,03	6	7,2±3,60	6	42,7±16,29
	10,0 <	4	3,3±1,81	5	8,3±2,60	5	81,6±15,56
	η	0,358		0,059		0,346	

49,6±16,20 нмоль/л. Пропорційне підвищення вмісту вказаного ізоциму в класах варіаційного ряду призводить до зростання концентрацій: на 40,0 % тестостерону і 34,0 % естрадіолу, а прогестерону не змінюється. За більше 20,0 % S2 концентрація гормонів найвища. Різниця між мінімальним і

максимальним значеннями концентрацій тестостерону статистично вірогідна ($p < 0,01$). Кореляційне відношення за вмістом S2-іозиму для концентрацій тестостерону сильне ($\eta = 0,715$), естрадіолу - середньої сили ($\eta = 0,343$), а прогестерону - слабке ($\eta = 0,286$).

За менше 15,0 % S3 концентрація тестостерону висока ($5,1 \pm 0,85$ нмоль/л), за збільшення до 20,0 % знижується на 95,1 % ($p < 0,001$), а при більше 20,0 % знову підвищується на 90,4 %. Подібну залежність встановлено при аналізі концентрацій естрадіолу і прогестерону: низькі значення, відповідно $2,5 \pm 0,80$ і $28,2 \pm 15,93$ нмоль/л проявляються за 15,0 – 20,0 % S3, а високі - 9,3 - 9,6 і 60,2 - 83,0 нмоль/л за менше 15,0 і більше 20,0 % іозиму. Кореляційне відношення за вмістом S3 для гормонів носить криволінійний характер середньої сили (тестостерону $\eta = 0,629$, естрадіолу $\eta = 0,423$ і прогестерону $\eta = 0,460$).

До 40,0 % S4 концентрація тестостерону в межах 4,0 - 4,4, естрадіолу - 6,8 - 10,9 і прогестерону - 61,4 - 64,0 нмоль/л, а за більше 40,0 % іозиму їх величини знижуються, відповідно, на 77,5 - 79,6 %, 8,4 - 49,6 % і 22,4 - 19,1 %. Кореляційне відношення за вмістом S4 для тестостерону і естрадіолу середньої сили (відповідно, $\eta = 0,536$ і $0,347$), а прогестерону - слабке ($\eta = 0,144$).

Не виявлено залежності між вмістом S5 та концентрацією естрадіолу і прогестерону, величини значень знаходяться, відповідно, в межах 6,3 - 9,1 та 51,7 - 68,3 нмоль/л. Іозим S5 проявляє зв'язок з концентрацією тестостерону, величина якого висока ($5,6 \pm 1,54$ нмоль/л) за менше 5,0 %, знижується на 55,4 % за збільшення до 10,0 % S5 і найнижча ($1,4 \pm 0,56$ нмоль/л; $p < 0,05$) при більше 10,0 % іозиму. Кореляційне відношення за вмістом S5-іозиму для тестостерону середньої сили ($\eta = 0,593$), а для естрадіолу і прогестерону - слабке ($\eta = 0,181 - 0,168$).

Динаміка змін концентрацій гормонів у культурі клітин залежно від активності КАТ свідчить, що за менше 20 мМ/хв×мг протеїну концентрація прогестерону висока ($74,6 \pm 12,60$ нмоль/л), за збільшення до 40 мМ/хв×мг протеїну знижується на 34,9 % і за більше 40 мМ/ хв×мг протеїну найнижча ($25,4 \pm 12,11$ нмоль/л; табл. 3.32). Подібні зміни встановлені при аналізі

Зв'язок активності КАТ з концентрацією гормонів

Активність КАТ, мМ/ хв×мг протеїну	Концентрація гормонів, нмоль/л					
	Тестостерон		Естрадіол		Прогестерон	
	n	M±m	n	M±m	n	M±m
> 0,40	2	2,0±0,05	7	9,2±4,20	7	25,4±12,11*
0,20 - 0,40	8	2,6±1,24	23	9,3±1,20	23	48,6±8,20
0,20 <	10	4,2±1,04	11	10,8±2,60	11	74,6±12,60
η	0,272		0,090		0,404	

залежності концентрації тестостерону від КАТ: за менше 0,20 мМ/хв×мг протеїну вона висока (4,2±1,04 нмоль/л), а за більше 20 % знижується на 38,1 - 52,4 %. Різниця між максимальною і мінімальною величинами значень знаходиться в межах похибки середнього арифметичного і статистично не вірогідна. Концентрація естрадіолу слабо залежала від активності КАТ клітин гранульози: різниця між мінімальним і максимальним значеннями показника при зміні величин значень у класах варіаційного ряду від менше 0,20 до 0,40 і більше мМ/ хв×мг протеїну становить 13,9 - 14,9 %, що в межах похибки середнього арифметичного. Кореляційне відношення за активністю КАТ для концентрації прогестерону негативне середньої сили ($\eta = 0,404$), а тестостерону і естрадіолу - слабке (відповідно $\eta = 0,272$ і $0,090$).

Поряд з залежністю від активності КАТ, концентрації гормонів у культурі клітин проявляють кореляцію з вмістом ізозимів ензиму. Так, за менше 20 % КАТ1 концентрація тестостерону висока (5,7±1,26 нмоль/л), при збільшенні до 40 % ізозиму знижується на 38,6 % і при більше 60 % низька (1,7±1,02 нмоль/л; табл. 3.33). Різниця між мінімальною і максимальною величинами значень тестостерону становить 70,2 % ($p < 0,05$). При зміні вмісту КАТ1 в класах варіаційного ряду від мінімального до максимального значень концентрація естрадіолу відрізняється на 4,1 нмоль/л, а прогестерону на 13,8 нмоль/л, що в

Зв'язок вмісту ізоцимів КАТ з концентрацією гормонів

Класи варіаційного ряду		Концентрація гормонів, нмоль/л					
		Тестостерон		Естрадіол		Прогестерон	
		n	M±m	n	M±m	n	M±m
КАТ1, %	> 60,0	6	1,7±1,02*	14	10,1±2,20	14	56,1±12,05
	40,1 – 60,0	6	3,5±1,50	10	8,3±1,20	10	44,6±12,68
	20,0 – 40,0	3	3,5±1,49	6	6,0±1,30	6	53,8±13,56
	20,0 <	6	5,7±1,26	18	9,2±2,30	18	42,3±9,75
	η	0,446		0,173		0,154	
КАТ2, %	> 75,0	6	5,7±1,26	18	9,2±2,30	18	42,3±9,75
	45,1 – 75,0	7	4,3±1,29	13	7,9±1,10	13	51,5±11,87
	15,0 – 45,0	5	0,7±0,32**	10	8,9±1,60	10	52,5±12,55
	15,0 <	3	2,6±1,85	7	9,8±3,60	7	51,4±15,65
	η	0,545		0,088		0,115	

межах похибки середнього арифметичного. Кореляційне відношення за КАТ1 для концентрації тестостерону негативне середньої сили ($\eta = 0,446$), а для естрадіолу і прогестерону - слабке ($\eta = 0,173$ і $0,154$).

Збільшення вмісту КАТ2, на відміну від КАТ1, призводить до зростання концентрації тестостерону. Так, до 45 % ізоциму концентрація гормону $0,7 - 2,6$ нмоль/л, за збільшення до 75 % КАТ2 зростає на $39,6 - 83,8$ % і за більше 75 % максимальна ($5,7 \pm 1,26$ нмоль/л). Поряд з цим, виявлено слабкий вплив КАТ2 на концентрацію естрадіолу і прогестерону: при зміні вмісту ізоциму в класах варіаційного ряду від мінімального до максимального значень концентрація відрізняється, відповідно, на $1,9$ нмоль/л і $10,2$ нмоль/л, що в межах похибки середнього арифметичного. Кореляційне відношення за вмістом КАТ2 для концентрації тестостерону позитивне середньої сили ($\eta = 0,545$), а естрадіолу і прогестерону слабке ($\eta = 0,088$ і $0,115$).

Активність ГПО культури клітин впливає на інтенсивність синтезу

прогестерону гранулозою. Так, за менше 0,25 мкМ/хв×мг протеїну концентрація прогестерону низька ($34,2 \pm 7,52$ нмоль/л), при збільшенні до 0,50 мкМ/ хв×мг протеїну зростає на 42,9 % і при більше 0,50 мкМ/ хв×мг протеїну ГПО висока ($96,8 \pm 1,95$ нмоль/л; табл. 3.34). Різниця між мінімальною і

Таблиця 3.34

Зв'язок активності ГПО з концентрацією гормонів

Активність ГПО, мкМ/ хв×мг протеїну	Концентрація гормонів, нмоль/л					
	Тестостерон		Естрадіол		Прогестерон	
	n	M±m	n	M±m	n	M±m
> 0,50	4	5,3±1,53	4	9,6±0,50	4	96,8±1,95
0,25 - 0,50	4	5,8±1,38	6	11,7±4,20	6	59,8±16,42
0,25 <	2	5,7±3,04	21	11,1±1,70	21	34,2±7,52***
η	0,070		0,076		0,554	

максимальною величинами прогестерону становить 74,7 % ($p < 0,001$).

Не виявлено залежності концентрацій тестостерону і естрадіолу від активності ГПО: різниця величин значень при пропорційному зростанні активності ензиму в класах варіаційного ряду від мінімального до максимального значень, відповідно, 8,7 і 18,0 %, що знаходиться в межах похибки середнього арифметичного. Кореляційне відношення за активністю ГПО для концентрації прогестерону позитивне середньої сили ($\eta = 0,554$), для тестостерону і естрадіолу - слабке ($\eta = 0,070$ і $0,076$).

Крім залежності концентрації гормонів в культурі клітин від активності ГПО, їх величини значень проявляють кореляції з окремими ізозимами ензиму. Зокрема, при 15 - 30 % ГПО1 концентрація тестостерону низька ($2,9 \pm 1,13$ нмоль/л), а за менше 15 і більше 30 % вища, відповідно на 52,5 і 48,3 % (табл. 3.35). Від ГПО1 слабо залежить концентрація естрадіолу: за збільшення вмісту ізозиму в класах варіаційного ряду більше ніж в два рази концентрація гормону відрізняється на 1,3 нмоль/л, що в межах похибки

Зв'язок вмісту ізозимів ГПО з концентрацією гормонів

Класи варіаційного ряду		Концентрація гормонів, нмоль/л					
		Тестостерон		Естрадіол		Прогестерон	
		n	M±m	n	M±m	n	M±m
ГПО5, %	> 20	6	4,7±1,48	12	9,3±1,80	12	57,4±10,70
	15 - 20	3	2,8±1,84	6	9,7±3,80	6	25,0±13,66
	15 <	5	6,3±1,07	24	9,1±1,80	24	41,6±8,13
	η	0,388		0,025		0,273	
ГПО4, %	> 15	3	4,1±1,25	11	6,1±1,80	11	48,7±12,19
	5 - 15	3	2,8±1,84	16	7,6±1,80	16	33,4±8,78
	5 <	8	5,9±1,21	15	13,3±2,50	15	51,1±11,29
	η	0,390		0,388		0,217	
ГПО3, %	> 30	4	3,2±1,40	14	14,0±2,90	14	47,7±11,32
	15 - 30	6	4,8±1,44	9	7,2±1,40	9	49,0±12,63
	15 <	4	6,7±1,39	19	6,8±1,40*	19	38,3±8,67
	η	0,393		0,418		0,131	
ГПО2, %	> 30	5	7,1±1,02	15	7,4±2,00	15	32,4±9,56
	15 - 30	3	2,7±0,77*	10	8,5±2,40	10	60,3±11,14
	15 <	6	4,1±1,57	17	11,3±2,10	17	44,0±9,88
	η	0,513		0,222		0,279	
ГПО1, %	> 30	3	5,6±2,40	12	9,9±2,60	12	34,0±11,60
	15 - 30	5	2,9±1,13	15	8,6±2,30	15	41,7±9,17
	15 <	6	6,1±1,17	15	9,4±2,00	15	53,6±11,19
	η	0,421		0,064		0,211	

середнього арифметичного. Концентрація прогестерону проявляє тенденцію до зниження: до 15 % ГПО1 значення 53,6±11,19 нмоль/л, за збільшення до 30 % ізозиму нижча на 22,3 % і за більше 30 % ще знижується на 18,4 % до 34,0±11,60 нмоль/л. Кореляційне відношення за вмістом ГПО1 для концентрації

тестостерону криволінійне середньої сили ($\eta = 0,421$), естрадіолу і прогестерону слабке ($\eta = 0,064$ і $0,211$).

Аналіз залежності концентрації гормонів в культурі клітин від ГПО2 свідчить, що до 30 % ізолиму концентрація тестостерону в межах 2,7 - 4,1 нмоль/л, а при більше 30 % зростає на 42,2 - 61,9 %. Концентрація естрадіолу висока ($11,3 \pm 2,10$ нмоль/л) за менше 15 % ГПО2, при збільшенні до 30 % ізолиму знижується на 24,7 % і при більше 30 % становить $7,4 \pm 2,00$ нмоль/л, що на 34,5 % нижче, ніж початкове значення. Концентрація прогестерону максимальна ($60,3 \pm 11,14$ нмоль/л) за 15 - 30 % ГПО2, а за менше 15 % і більше 30 % ізолиму нижча, відповідно, на 27,0 і 46,2 %. Кореляційне відношення за вмістом ГПО2 для концентрації тестостерону криволінійне середньої сили ($\eta = 0,513$), естрадіолу і прогестерону слабке ($\eta = 0,222$ і $0,279$). За менше 15 % ГПО3 концентрація тестостерону висока ($6,7 \pm 1,39$ нмоль/л), при збільшенні до 30 % знижується на 28,3 % і при більше 30 % нижча на 52,2 %. Концентрація естрадіолу, навпаки, за менше 15 % ГПО3 низька ($6,8 \pm 1,40$ нмоль/л), за збільшення до 30 % ГПО3 зростає на 5,5 % і за більше 30 % вища на 51,4 %. Концентрація прогестерону в межах 47,7 - 49,0 нмоль/л за вмісту більше 30 % ГПО3, а за менше 30 % ізолиму нижча на 19,7 - 21,8 %. Кореляційне відношення за вмістом ГПО3 для концентрації тестостерону негативне середньої сили ($\eta = 0,393$), естрадіолу позитивне середньої сили ($\eta = 0,418$), а прогестерону слабке ($\eta = 0,131$). Оцінюванням залежності синтезу гормонів від вмісту ГПО4 у клітинах виявлено, що за менше 5 та більше 15 % ізолиму концентрації тестостерону і прогестерону в межах, відповідно, 4,1 - 5,9 та 48,7 - 51,1 нмоль/л, а за 5 - 15 % нижчі на 31,7 - 52,5 % та 31,4 - 34,6 %. Концентрація естрадіолу низька ($6,1 \pm 1,80$ нмоль/л) за більше 15 % ГПО4, вища на 19,7 % за вмісту 5 - 15 % ізолиму, а найвища ($13,3 \pm 2,50$ нмоль/л) за менше 5 %. Кореляційне відношення за ГПО4 для концентрації тестостерону і естрадіолу середньої сили ($\eta = 0,390$ і $0,388$), а прогестерону слабке ($\eta = 0,217$). За менше 15 і більше 20 % ГПО5 концентрації тестостерону і прогестерону знаходяться в межах, відповідно, 4,7 - 6,3 і 41,6 - 57,4 нмоль/л, а за 15 - 20 %

нижчі на 40,4 - 55,5 % і 39,9 - 56,4 %. Концентрація естрадіолу від вмісту ГПО5 залежить слабо: величина значення не залежно від класу варіаційного ряду, становить 9,1 - 9,7 нмоль/л. Кореляційне відношення за вмістом ГПО5 для концентрації тестостерону криволінійне середньої сили ($\eta = 0,388$), а естрадіолу і прогестерону - слабке ($\eta = 0,025$ і $0,273$).

Від вмісту загального протеїну в культурі клітин залежить інтенсивність утворення гормонів гранулозою. Так, до 15 мг/мл протеїну концентрація тестостерону в межах 6,8 - 8,3 нмоль/л, за збільшення до 20 мг/мл знижується на 50,7 % ($p < 0,05$) і за більше 20 мг/мл - найнижча ($2,3 \pm 0,94$ нмоль/л; табл. 3.36). На противагу, до 15 мг/мл протеїну концентрація прогестерону в межах

Таблиця 3.36

Зв'язок вмісту загального протеїну з концентрацією гормонів, нмоль/л

Вміст загального протеїну, мг/мл	Тестостерон		Естрадіол		Прогестерон	
	n	M \pm m	n	M \pm m	n	M \pm m
> 20	12	2,3 \pm 0,94 ^{***}	14	8,0 \pm 1,70	14	74,9 \pm 10,99
15 – 20	5	4,1 \pm 1,31 [*]	12	11,2 \pm 1,90	12	61,8 \pm 11,38
10 – 15	3	8,3 \pm 0,73	11	12,4 \pm 2,80	11	30,7 \pm 11,10 ^{**}
10 <	4	6,8 \pm 1,46	16	10,1 \pm 2,40	16	26,6 \pm 7,78 ^{**}
η	0,500		0,179		0,524	

26,6 - 30,7 нмоль/л, при збільшенні до 20 мг/мл підвищується на 57,0 % і за більше 20 мг/мл найвища 74,9 \pm 10,99 нмоль/л. Між вмістом протеїну і концентрацією естрадіолу виявлена слабка залежність: зі зміною вмісту протеїну від менше 15 до 20 і більше мг/мл величина значення 8,0 - 12,4 нмоль/л, різниця 4,4 нмоль/л (35,5 %), що в межах похибки середнього арифметичного. Кореляційне відношення за вмістом загального протеїну в культурі клітин і концентрацією тестостерону негативне середньої сили ($\eta = 0,500$), прогестерону - позитивне середньої сили ($\eta = 0,524$) і естрадіолу - слабке ($\eta = 0,179$).

За вмісту γ 3-глобулінів до 15 % концентрація тестостерону і прогестерону в межах, відповідно, 1,1 - 1,2 і 27,8 - 36,6 нмоль/л, а за більше

15 % зростають на 74,4 ($p < 0,05$) і 46,6 % ($p < 0,01$; табл. 3.37). Концентрація

Таблиця 3.37

Зв'язок між вмістом γ -глобулінів і концентрацією гормонів

Класи варіаційного ряду		Концентрація гормонів, нмоль/л					
		Тестостерон		Естрадіол		Прогестерон	
		n	M \pm m	n	M \pm m	n	M \pm m
$\gamma 3$, %	> 15	6	4,3 \pm 1,27	20	9,1 \pm 1,10	20	68,6 \pm 9,77
	5,0 - 15,0	15	1,1 \pm 0,61*	43	9,6 \pm 1,30	44	36,6 \pm 5,73**
	5,0 <	10	1,2 \pm 0,88	15	4,6 \pm 1,40**	16	27,8 \pm 9,45**
	η	0,438		0,272		0,373	
$\gamma 2$, %	> 10,0	8	1,4 \pm 1,08	35	9,7 \pm 1,40	36	42,7 \pm 7,32
	5,0 - 10,0	15	2,3 \pm 0,82	31	7,7 \pm 1,20	32	43,5 \pm 7,07
	5,0 <	10	1,1 \pm 0,67	14	7,4 \pm 1,50	14	36,0 \pm 11,56
	η	0,192		0,154		0,066	
$\gamma 1$, %	> 10,0	14	1,3 \pm 0,73	37	8,2 \pm 1,30	38	33,5 \pm 7,01
	5,0 - 10,0	9	1,7 \pm 0,89	23	8,9 \pm 1,30	23	47,3 \pm 8,34
	5,0 <	15	1,6 \pm 0,76	25	7,2 \pm 1,30	26	46,0 \pm 8,06
	η	0,065		0,093		0,160	

естрадіолу за менше 5 % становить 4,6 \pm 1,40 нмоль/л, при збільшенні до 15 % і більше зростає на 49,4 - 52,1 % ($p < 0,01$) до 9,1 - 9,6 нмоль/л. Кореляційне відношення за вмісту $\gamma 3$ -глобулінів для концентрації тестостерону і прогестерону позитивне середньої сили ($\eta = 0,438$ і $0,373$), а естрадіолу слабке ($\eta = 0,272$).

За збільшення вмісту $\gamma 1$ - і $\gamma 2$ -глобулінів в класах варіаційного ряду від мінімальних до максимальних величин інтенсивність синтезу гормонів культурою клітин гранульози майже не змінюється. Концентрації гормонів знаходяться в межах: тестостерону - 1,1 - 2,3, естрадіолу - 7,2 - 9,7 і прогестерону - 33,5 - 47,3 нмоль/л, різниця між величинами значень в межах похибки середнього арифметичного і статистично не вірогідна ($p > 0,05$).

Кореляційне відношення між вмістом γ 1- і γ 2-глобулінів та концентрацією гормонів слабке ($\eta = 0,065 - 0,192$).

Інтенсивність синтезу гормонів клітинами гранульози залежить від β -глобулінів: за менше 10 % концентрація тестостерону - $2,0 \pm 0,99$, естрадіолу - $10,3 \pm 1,20$ і прогестерону - $52,1 \pm 6,84$ нмоль/л (табл. 3.38). Підвищення до 15 %

Таблиця 3.38

Зв'язок між вмістом β -глобулінів і концентрацією гормонів

Вміст β -глобулінів, %	Концентрація гормонів, нмоль/л					
	Тестостерон		Естрадіол		Прогестерон	
	n	M \pm m	n	M \pm m	n	M \pm m
> 15,0	20	0,9 \pm 0,52	21	4,3 \pm 0,90***	22	38,4 \pm 9,26
10,0 - 15,0	9	2,2 \pm 1,00	27	8,0 \pm 1,50	27	27,0 \pm 7,02*
10,0 <	9	2,0 \pm 0,99	37	10,3 \pm 1,20	38	52,1 \pm 6,84
η	0,217		0,338		0,263	

β -глобулінів не змінює концентрацію тестостерону ($2,2 \pm 1,0$ нмоль/л), а естрадіолу і прогестерону - знижуються, відповідно, на 22,3 і 48,2 % ($p < 0,05$). За більше 15 % утворення тестостерону і естрадіолу клітинами гранульози мінімальне - $0,9 \pm 0,52$ і $4,3 \pm 0,90$ нмоль/л, а прогестерону майже не змінюється ($38,4 \pm 9,26$ нмоль/л). Кореляційне відношення між вмістом β -глобулінів і концентрацією естрадіолу негативне середньої сили ($\eta = 0,338$), а тестостерону і прогестерону слабке ($\eta = 0,217$ і $0,263$).

Оцінюванням залежності утворення гормонів культурою гранульози від вмісту α -глобулінів виявлено, що при зміні величин значень кожної фракції (α 1, α 2- і α 3-глобулінів) у класах варіаційного ряду від мінімальної до максимальної величини значень концентрація тестостерону знаходиться в межах 1,0 - 2,4 нмоль/л, естрадіолу - 7,0 - 10,2 нмоль/л і прогестерону - 26,7 - 49,8 нмоль/л (табл. 3.39). Різниця між величинами значень гормонів становить, відповідно, 0,1 - 1,3, 1,0 - 3,5 і 2,2 - 21,9 нмоль/л. Кореляційне відношення між вмістом α -глобулінів для концентрації гормонів слабке ($\eta = 0,020 - 0,236$).

Зв'язок між вмістом α -глобулінів і концентрацією гормонів

Класи варіаційного ряду		Концентрація гормонів, нмоль/л					
		Тестостерон		Естрадіол		Прогестерон	
		n	M \pm m	n	M \pm m	n	M \pm m
$\alpha 3$ -, %	> 10,0	7	2,4 \pm 1,25	16	10,2 \pm 1,90	16	37,0 \pm 9,97
	2,5 - 10,0	14	1,5 \pm 0,73	45	7,3 \pm 0,90	47	39,4 \pm 5,91
	2,5 <	14	1,1 \pm 0,69	22	7,8 \pm 1,70	22	41,6 \pm 9,75
	η	0,180		0,162		0,038	
$\alpha 2$ -, %	> 7,5	5	1,0 \pm 0,81	23	9,2 \pm 1,70	24	43,3 \pm 8,44
	2,5 - 7,5	13	1,9 \pm 0,91	35	8,2 \pm 1,10	35	32,9 \pm 6,53
	2,5 <	19	1,4 \pm 0,63	25	7,0 \pm 1,50	25	49,8 \pm 9,18
	η	0,113		0,177		0,176	
$\alpha 1$ -, %	> 10,0	6	1,3 \pm 1,02	15	7,0 \pm 1,00	15	34,4 \pm 10,99
	5,0 - 10,0	7	1,2 \pm 0,93	21	10,5 \pm 1,90	21	26,7 \pm 6,96
	5,0 <	22	1,2 \pm 0,50	44	7,2 \pm 1,00	46	48,6 \pm 6,51
	η	0,020		0,212		0,236	

Концентрація гормонів в культурі клітин гранульози неоднозначно залежить від вмісту альбуміну: за менше 20 % концентрація тестостерону низька (0,6 \pm 0,35 нмоль/л), при збільшенні до 30 % зростає на 83,3 % ($p < 0,05$) і за більше 30 % максимальна (6,9 \pm 0,37 нмоль/л; табл. 3. 40). Концентрації естрадіолу і прогестерону слабо залежать від вмісту альбуміну: при зміні величини біохімічного показника в класах варіаційного ряду від мінімального до максимального значень концентрація гормонів, відповідно, 6,5 - 9,4 і 31,6 - 45,7 нмоль/л, різниця 1,3 - 2,9 і 1,4 - 12,7 нмоль/л, що в межах похибки середнього арифметичного. Кореляційне відношення за вмістом альбуміну для тестостерону позитивне середньої сили ($\eta = 0,505$), а естрадіолу і прогестерону слабке ($\eta = 0,161 - 0,155$). Від вмісту пре-альбумінів залежить концентрація

Зв'язок між вмістом альбуміну і пре-альбумінів та концентрацією гормонів

Класи варіаційного ряду		Концентрація гормонів, нмоль/л					
		Тестостерон		Естрадіол		Прогестерон	
		n	M±m	n	M±m	n	M±m
альбумін, %	> 30,0	13	6,9±0,37	20	6,5±1,70	21	45,7±8,90
	20,0 - 30,0	11	3,6±1,27*	30	9,4±1,30	30	31,6±7,06
	20,0 <	13	0,6±0,35***	34	7,8±1,20	35	44,3±7,49
	η	0,505		0,161		0,155	
преальбуміни, %	> 10,0	3	0,8±0,39	21	13,1±1,80	21	30,1±6,89*
	5,0 - 10,0	12	2,5±1,11	35	7,5±1,10**	35	51,3±7,71
	5,0 <	12	3,0±1,11	18	8,2±2,00	18	34,8±9,99
	η	0,194		0,325		0,237	

естрадіолу: до 10 % концентрація в межах 7,5 - 8,2 нмоль/л, а за більше 10 % зростає на 37,4 - 42,7 % ($p < 0,01$) до 13,1±1,80 нмоль/л. На здатність утворювати тестостерон і прогестерон вміст пре-альбумінів проявляє слабкий вплив: за зміни їх вмісту в класах варіаційного ряду від мінімальної до максимальної величин різниця між величинами значень вказаних гормонів становить, відповідно, 0,5 - 2,2 і 4,7 - 21,2 нмоль/л. Кореляційне відношення за вмістом пре-альбумінів для естрадіолу позитивне середньої сили ($\eta = 0,325$), а тестостерону і прогестерону слабке ($\eta = 0,194 - 0,237$).

Вивченням зв'язків між окремими протеїнами культури клітин гранульози й інтенсивністю синтезу гормонів встановлено, що зі збільшенням вмісту протеїнів з ММ більше 94,6 кДа концентрації тестостерону та прогестерону майже не змінюються і становлять, відповідно, 2,2 - 4,3 і 30,0 - 40,9 нмоль/л (табл. 3.41). Різниця між величинами значень 0,2 - 1,1 та 4,5 - 10,9 нмоль/л, що в межах похибки середнього арифметичного. Висока концентрація проявляється при вмісті 7,6 - 10,0 % протеїнів більше 94,6 кДа, а за менше 2,5 % та більше 10 % - вона понижена (5,1 - 7,4 нмоль/л). Різниця між мінімальним і

Зв'язок між вмістом протеїнів 94,6 кДа і більше з концентрацією гормонів

Класи варіаційного ряду		Концентрація гормонів, нмоль/л					
		Тестостерон		Естрадіол		Прогестерон	
		n	M±m	n	M±m	n	M±m
більше 94,6 кДа, %	> 10,0	7	2,2±0,89	14	7,4±2,77	14	36,4±11,39
	7,6 - 10,0	7	4,1±1,59	14	12,0±2,27	14	40,9±12,19
	5,1 - 7,5	4	4,3±2,17	15	10,2±1,83	15	30,0±8,04
	2,5 - 5,0	9	3,5±1,53	23	9,2±1,43	23	35,0±8,48
	2,5 <	18	3,3±0,91	23	5,1±0,89**	23	33,2±7,50
	η	0,153		0,327		0,088	
94,6 кДа, %	> 10,0	10	3,9±1,32	16	7,7±1,84	16	36,7±9,91
	7,6 - 10,0	8	3,1±1,38	20	10,2±2,26	20	29,1±8,40
	5,1 - 7,5	6	2,3±1,40	11	5,9±1,24	11	41,9±12,09
	2,5 - 5,0	13	2,3±0,92	30	7,9±1,26	30	36,2±7,28
	2,5 <	7	4,9±1,61	13	9,3±1,54	13	32,5±9,90
	η	0,246		0,187		0,106	

максимальним значеннями становить 57,5 % ($p < 0,01$). Кореляційне відношення за вмістом протеїнів з ММ більше 94,6 кДа для тестостерону і прогестерону слабе ($\eta = 0,153$ і $0,088$), а для естрадіолу середньої сили ($\eta = 0,327$).

Оцінюванням залежності концентрації гормонів від протеїнів ММ 94,6 кДа встановлено, що концентрація тестостерону знаходиться в межах 2,3 - 4,9, естрадіолу - 5,9 - 10,2 і прогестерону - 29,1 - 41,9 нмоль/л. Різниця між величинами значень становить, відповідно, 1,0 - 2,6, 0,9 - 4,3 і 5,2 - 12,8 нмоль/л, що в межах похибки середнього арифметичного. Кореляційне відношення за вмістом протеїнів з ММ 94,6 кДа для концентрації гормонів слабе ($\eta = 0,106 - 0,246$).

Подібний результат отримано при вивченні концентрації гормонів від вмісту протеїнів 66,2 - 94,6 кДа. Встановлено, що незалежно від класу варіаційного ряду протеїнів 66,2 - 94,6 кДа концентрація тестостерону і естрадіолу становила, відповідно, 1,8 - 4,8 і 6,6 - 10,2 нмоль/л, різниця між величинами значень - 1,1 - 3,0 і 2,8 - 3,6 нмоль/л і знаходиться в межах похибки середнього арифметичного (табл. 3.42). Концентрація прогестерону

Таблиця 3.42

Зв'язок між вмістом протеїнів 45,0 - 94,6 кДа і концентрацією гормонів

Класи варіаційного ряду		Концентрація гормонів, нмоль/л					
		Тестостерон		Естрадіол		Прогестерон	
		n	M±m	n	M±m	n	M±m
66,2-94,6 кДа, %	> 10,0	13	1,8±1,01	21	7,4±1,83	21	21,1±7,38
	7,6 - 10,0	9	4,8±1,37	16	10,2±2,16	16	35,8±9,86
	5,1 - 7,5	7	3,7±1,35	16	9,3±1,43	16	39,5±9,27
	2,5 - 5,0	10	2,6±1,17	24	6,6±0,94	24	49,1±8,99
	2,5 <	9	3,7±1,27	16	8,7±2,45	16	24,7±7,39
	η	0,278		0,182		0,290	
66,2 кДа, %	> 15,0	18	1,6±0,65*	21	4,8±1,26***	21	42,2±9,32
	10,1 - 15,0	10	5,4±1,45	16	7,7±2,07	16	24,5±8,42
	5,0 - 10,0	10	4,1±1,08	24	11,9±1,59	24	39,4±7,85
	5,0 <	10	3,1±1,25	33	8,1±1,14	33	31,4±6,39
	η	0,378		0,347		0,170	
45,0-66,2 кДа, %	> 10,0	19	3,0±0,88	22	6,2±1,11	22	46,9±9,56
	7,6 - 10,0	7	5,6±1,50	24	10,7±2,01	24	24,6±6,03*
	5,1 - 7,5	3	3,7±2,53	10	10,4±1,94	10	25,7±8,25
	2,5 - 5,0	9	4,1±1,37	25	8,4±1,15	25	41,0±8,42
	2,5 <	9	0,5±0,22**	12	3,8±1,32**	12	21,0±8,03*
	η	0,404		0,335		0,279	

49,1±8,99 нмоль/л при 2,5 - 5,0 % протеїнів з ММ 66,2 - 94,6 кДа, при підвищенні до 10 % зменшується на 27,1 % і при більше 10 % протеїнів становить 21,1±7,38 нмоль/л. Різниця між мінімальним і максимальним значеннями - 57,0 % ($p < 0,01$). Кореляційне відношення за вмістом протеїнів з ММ 66,2 - 94,6 кДа для концентрації гормонів слабе ($\eta = 0,182 - 0,290$).

За вмісту до 15,0 % з ММ 66,2 кДа вказаних протеїнів проявляється висока концентрація тестостерону (3,1 - 5,4 нМ/л) і естрадіолу (7,7 - 11,9 нмоль/л), а за більше 15,0 % знижується їх утворення, відповідно, на 48,4 - 70,4 % ($p < 0,05$) і на 37,7 - 59,7 % ($p < 0,001$). Концентрація прогестерону незалежно від класу варіаційного ряду протеїнів 66,2 кДа становить, 24,5 - 42,2 нмоль/л, різниця між величинами значень - 17,7 нмоль/л і знаходиться в межах похибки середнього арифметичного. Кореляційне відношення за вмістом протеїнів з ММ 66,2 кДа для концентрації тестостерону і естрадіолу середньої сили (відповідно, $\eta = 0,378$ і $0,347$), прогестерону - слабе ($\eta = 0,170$). При пропорційному збільшенні протеїнів з молекулярною масою 45,0 - 66,2 кДа підвищується здатність гранульози утворювати гормони. За менше 2,5 % вказаних протеїнів, встановлено низькі величини значень тестостерону ($0,5 \pm 0,22$ нмоль/л), естрадіолу ($3,8 \pm 1,32$ нмоль/л) і прогестерону ($21,0 \pm 8,03$ нМ/л), за підвищення до 10 % протеїнів з ММ 45,0 - 66,2 кДа вони зростають, відповідно, на 91,2 % ($p < 0,01$), 64,5 % ($p < 0,01$) і 17,1 %. За більше 10 % протеїнів вказаної зони концентрація тестостерону і естрадіолу проявляють тенденцію до зниження, відповідно, на 46,4 і 42,0%, а прогестерону досягає максимальної величини ($46,9 \pm 9,56$ нмоль/л). Кореляційне відношення за вмістом протеїнів з ММ 45,0 - 66,2 кДа для концентрації тестостерону і естрадіолу середньої сили ($\eta = 0,404$ і $0,335$), а прогестерону слабе ($\eta = 0,279$).

Аналіз залежності концентрації гормонів від вмісту протеїнів з ММ 45,0 кДа свідчить, що не залежно від класу варіаційного ряду, величини значень тестостерону - 2,3 - 4,3 нмоль/л і прогестерону - 21,5 - 37,4 нмоль/л, різниця, відповідно, 0,2 - 2 і 2,2 - 15,9 нмоль/л знаходиться в межах похибки середнього арифметичного (табл. 3. 43). Концентрація естрадіолу низька ($5,8 \pm 0,93$ нмоль/л)

Зв'язок між вмістом протеїнів 31,0 - 45,0 кДа і концентрацією гормонів

Класи варіаційного ряду		Концентрація гормонів, нмоль/л					
		Тестостерон		Естрадіол		Прогестерон	
		n	M±m	n	M±m	n	M±m
45,0 кДа, %	> 15,0	4	4,3±1,87	6	9,0±2,26	6	21,5±9,36
	10,1 - 15,0	7	3,9±1,43	30	12,3±1,64	30	33,4±6,48
	5,0 - 10,0	10	4,1±1,25	25	6,2±1,05**	25	37,4±8,17
	5,0 <	25	2,3±0,74	31	5,8±0,93***	31	35,2±7,10
	η	0,234		0,413		0,102	
31,0 - 45,0 кДа, %	> 7,5	12	3,4±1,30	19	6,2±1,27	19	24,9±7,19
	5,1 - 7,5	10	4,8±1,35	32	9,8±1,45	32	32,4±6,52
	2,5 - 5,0	12	3,9±1,23	21	9,8±1,39	21	47,4±9,82
	2,5 <	12	1,5±0,66*	18	7,3±1,98	18	34,1±8,65
	η	0,307		0,218		0,209	
31,0 кДа, %	> 7,5	14	3,0±1,09	24	6,8±1,03	24	31,2±7,44
	5,1 - 7,5	5	2,2±1,73	22	8,6±1,62	22	23,6±5,91*
	2,5 - 5,0	16	5,1±1,04	32	10,4±1,58	32	46,1±7,39
	2,5 <	13	1,4±0,78**	15	4,8±1,36**	15	26,7±10,1
	η	0,387		0,278		0,254	

за менше 5 % протеїнів з ММ 45,0 кДа, за збільшення до 15 % зростає на 52,8 % ($p < 0,001$) до $12,3 \pm 1,64$ нмоль/л. За більше 15 % протеїнів 45,0 кДа проявляється тенденція до зниження концентрації гормону. Таким чином, між вмістом протеїнів з ММ 45,0 кДа і концентрацією естрадіолу існує кореляція позитивна середньої сили ($\eta = 0,413$), а тестостерону і прогестерону - слабка ($\eta = 0,234$ і $0,102$).

Оцінювання залежності тестостерону від вмісту протеїнів 31,0 - 45,0 кДа встановлено, що за менше 2,5 % концентрація гормону - $1,5 \pm 0,66$ нмоль/л,

збільшення до 7,5 % підвищує її на 68,7 % і за більше 7,5 % проявляє тенденцію до зниження на 1,4 нмоль/л (29,2 %). Вміст білків зони з ММ 31,0 - 45,0 кДа слабо впливає на інтенсивність синтезу естрадіолу і прогестерону гранульозою: величини значень знаходяться в межах, відповідно, 6,2 - 9,8 і 24,9 - 47,4 нмоль/л, різниця становить - 2,5 - 3,6 і 13,0 - 22,5 нмоль/л і знаходиться в межах похибки середнього арифметичного. Кореляційне відношення за вмістом протеїнів з ММ 31,0 - 45,0 кДа для концентрації тестостерону середньої сили ($\eta = 0,307$), а естрадіолу і прогестерону - слабке ($\eta = 0,209$ і $0,218$).

За вмісту 2,5 - 5,0 % протеїнів з ММ 31,0 кДа концентрація гормонів висока: тестостерону - $5,1 \pm 1,04$, естрадіолу - $10,4 \pm 1,58$ і прогестерону - $46,1 \pm 7,39$ нмоль/л. При мінімальному (менше 2,5 %) і максимальному (більше 7,5 %) значеннях вмісту вказаних протеїнів концентрація гормонів нижча: тестостерону, відповідно, на 72,5 ($p < 0,01$) і 41,2 %, естрадіолу - 53,8 ($p < 0,01$) і 34,6 %, а прогестерону на 42,0 і 32,3%. Кореляційне відношення за вмістом протеїнів 31,0 кДа для концентрації тестостерону середньої сили ($\eta = 0,387$), а естрадіолу і прогестерону - слабке ($\eta = 0,278$ і $0,254$).

За вмісту 4,1 - 6,0 % протеїнів 21,5 - 31,0 кДа концентрації тестостерону і естрадіолу максимальні, відповідно, $5,8 \pm 1,55$ і $11,5 \pm 1,70$ нмоль/л, а прогестерону низька - $25,1 \pm 5,82$ нмоль/л (табл. 3.44). За менше 2,0 % протеїнів вказаної зони концентрації тестостерону і естрадіолу низькі, відповідно, $2,0 \pm 0,77$ і $5,4 \pm 0,94$ нмоль/л, а прогестерону висока ($43,1 \pm 7,06$ нмоль/л). За більше 6,0 % протеїнів ММ 21,5 - 31,0 кДа концентрації гормонів знаходяться на рівні максимальних величин: тестостерону - $5,0 \pm 1,48$ нМ/л, естрадіолу - $10,0 \pm 2,06$ нмоль/л і прогестерону - $37,9 \pm 9,81$ нмоль/л. Кореляційне відношення за вмістом протеїнів з ММ 21,5 - 31,0 кДа для концентрації тестостерону і естрадіолу середньої сили ($\eta = 0,339$ і $0,347$), а прогестерону слабке - $\eta = 0,215$. Подібні результати отримані за вмісту 5,0 - 10,0 % протеїнів з ММ 21,5 кДа - концентрація гормонів максимальна (тестостерону - $5,2 \pm 1,35$ нмоль/л, естрадіолу - $13,0 \pm 1,61$ нмоль/л і прогестерону - $40,6 \pm 6,78$ нмоль/л). За менше 5,0 % і більше 15 % вмісту протеїнів концентрація гормонів нижча відповідно,

Зв'язок між вмістом протеїнів 21,5 - 31,0 кДа і концентрацією гормонів

Класи варіаційного ряду		Концентрація гормонів, нмоль/л					
		Тестостерон		Естрадіол		Прогестерон	
		n	M±m	n	M±m	n	M±m
21,5-31,0 кДа, %	> 6,0	6	5,0±1,48	18	10,0±2,06	18	37,9±9,81
	4,1 - 6,0	7	5,8±1,55	26	11,5±1,70	26	25,1±5,82*
	2,0 - 4,0	6	2,5±1,47	12	5,0±1,17**	12	27,1±8,30
	2,0 <	28	2,5±0,68	37	6,5±0,88**	37	43,1±7,06
	η	0,339		0,347		0,215	
21,5 кДа, %	> 15,0	8	2,2±0,84	13	7,3±1,99*	13	32,1±11,25
	10,1 - 15,0	9	5,0±1,43	22	7,0±1,25**	22	29,0±8,02
	5,0 - 10,0	10	5,2±1,35	28	13,0±1,61	28	40,6±6,78
	5,0 <	19	2,0±0,77*	29	5,4±0,94***	29	33,2±7,31
	η	0,391		0,439		0,122	

на 61,5 і 57,7% тестостерону, на 58,5 (p < 0,001) і 43,8 % (p < 0,05) естрадіолу та на 18,2 і 20,9 % прогестерону. Кореляційне відношення за вмістом білків з ММ 21,5 кДа для концентрації тестостерону і естрадіолу середньої сили (η = 0,391 і 0,439), а прогестерону слабке (η = 0,122).

За менше 5,0 % протеїнів з ММ 14,4 - 21,5 кДа концентрації тестостерону і естрадіолу низькі, відповідно 2,5±0,58 і 5,9±1,04 нмоль/л, при збільшенні до 25,0 % протеїнів концентрації зростають на 45,6 % і 52,4% (p<0,01; табл. 3.45). За більше 25,0 % вмісту протеїнів вказаної зони концентрація тестостерону максимальна (9,9±0,02 нмоль/л), що вище на 74,7 % (p < 0,001), ніж мінімальна. Концентрація прогестерону за 15,1 - 25,0 % протеїнів з ММ 14,4 - 21,5 кДа знаходиться в межах 22,6 - 29,2 нмоль/л, а за менше 5,0 % і більше 25,0 % концентрація прогестерону максимальна (44,3±11,48 нмоль/л). Кореляційне відношення за вмісту протеїнів з ММ 14,4 - 21,5 кДа для концентрації

Зв'язок між вмістом протеїнів менше 21,5 кДа та концентрацією гормонів

Класи варіаційного ряду		Концентрація гормонів, нмоль/л					
		Тестостерон		Естрадіол		Прогестерон	
		n	M±m	n	M±m	n	M±m
14,4-21,5 кДа, %	> 25,0	3	9,9±0,02	12	8,2±0,91*	12	44,3±11,48
	15,1 - 25,0	4	4,6±2,23	22	12,4±1,83	22	29,2±6,58
	5,0 - 15,0	8	3,4±1,41***	22	8,2±1,70	22	22,6±5,88
	5,0 <	32	2,5±0,58***	37	5,9±1,04**	37	40,1±7,27
	η	0,480		0,350		0,219	
14,4 кДа, %	> 4,0	6	3,6±1,19	22	6,3±1,00*	22	39,9±9,20
	3,1 - 4,0	5	4,3±1,64	8	11,4±2,00	8	66,2±14,5
	2,1 - 3,0	3	0,3±0,04*	14	8,9±2,50	14	64,3±11,86
	1,0 - 2,0	10	1,8±1,08	22	10,5±1,60	22	32,2±7,36*
	1,0 <	9	1,4±0,82	17	8,4±2,20	17	29,8±10,00*
	η	0,372		0,239		0,342	
менше 14,4 кДа, %	> 4,0	5	1,7±1,24	13	5,0±1,40*	13	27,1±9,88**
	3,1 - 4,0	6	2,6±1,43	8	5,6±1,40*	8	52,2±15,78
	2,1 - 3,0	6	3,0±1,34	25	9,0±1,20	25	63,2±8,60
	1,0 - 2,0	8	3,0±1,26	20	11,3±2,10	20	30,1±8,29**
	1,0 <	7	1,2±0,91	17	9,7±2,20	17	28,3±8,78**
	η	0,222		0,302		0,390	

тестостерону і естрадіолу середньої сили - $\eta = 0,480$ і $0,350$, а прогестерону слабке - $\eta = 0,219$.

За вмісту 3,1 - 4,0 % протеїнів з ММ 14,4 кДа проявляються максимальні концентрації тестостерону - $4,3\pm 1,64$ нМ/л, естрадіолу - $11,4\pm 2,00$ нмоль/л і прогестерону - $66,2\pm 14,5$ нмоль/л, а при менше 3,1 % і більше 4,0 % протеїнів вказаної зони концентрація гормонів в культурі клітин знижується, відповідно,

на 67,4 і 16,3 %, 26,3 і 44,7 % ($p < 0,05$), 54,9 ($p < 0,05$) і 39,7 %. Кореляційне відношення за вмістом протеїнів з ММ 14,4 кДа для концентрації тестостерону і прогестерону позитивне середньої сили ($\eta = 0,372$ і $0,342$), а естрадіолу слабе ($\eta = 0,239$).

При більше 4,0 % протеїнів з ММ менше 14,4 кДа концентрації естрадіолу і прогестерону низькі, відповідно, $5,0 \pm 1,40$ і $27,1 \pm 9,88$ нмоль/л, а при зменшенні до 3,0 % підвищуються, відповідно, на 44,4 % і на 57,1 % ($p < 0,01$). При нижче 1,0 % протеїнів з ММ менше 14,4 кДа концентрація прогестерону в культурі клітин знижується на 55,2 % ($p < 0,01$), а естрадіолу не змінюється, величина значення в межах 9,7 - 11,3 нмоль/л. Кореляційне відношення за вмістом протеїнів менше 14,4 кДа для концентрації естрадіолу і прогестерону середньої сили ($\eta = 0,302$ і $0,390$).

Аналіз залежності тестостерону від протеїнів з ММ менше 14,4 кДа свідчить, що при зміні їх вмісту в класах варіаційного ряду від мінімальної до максимальної величин концентрація гормону в межах 1,2 - 3,0 нмоль/л, різниця між значеннями 0,4 - 1,8 нмоль/л, що в межах похибки середнього арифметичного. Кореляційне відношення за вмістом білків менше 14,4 кДа для концентрації тестостерону слабе ($\eta = 0,222$).

Результати досліджень підрозділу опубліковані у 2 статтях [306, 307].

3.7. Вплив окремих факторів на інтенсивність окисних процесів і синтез гормонів клітинами гранульози

На інтенсивність окисних процесів клітин гранульозного шару фолікулів яєчників корів впливає тривалість і склад середовищ культивування. Так, дихальна активність гранульози через 7 діб культивування, не залежно від складу середовищ, майже однакова ($3,6 - 3,9$ нг-атом $O/xv \times 0,1$ мл СК; табл. 3. 46). Однак, відрізняється відновна здатність клітин, яка найвища ($4,2 \pm 1,06$ мВ/ $xv \times 0,1$ мл СК) у DMEM, нижча на 45,3% в RPMI-1640 і найнижча

Інтенсивність окисних процесів за культивування гранульози, $M \pm m$

Умови культивування		Споживання кисню, нг-атом O/хв×0,1 мл СК			Відновна здатність, мВ/хв×0,1 мл СК	
Середовище	Доба	n	O ₂	за дії K ₃ ...	без K ₃ ...	за дії K ₃ ...
BME	> 21	18	1,9±0,48	1,0±0,36	2,6±0,58	2,1±0,68
	21	26	3,4±0,52	0,6±0,26	4,1±0,47	2,0±0,84
	14	9	5,0±0,54	4,3±0,67	5,5±0,75	8,6±0,30
	7	7	3,9±0,60	1,5±0,03	1,4±0,42	0,8±0,04
DMEM	> 21	18	2,4±0,52	2,0±0,37	3,5±0,80	2,5±0,55
	21	12	1,9±0,78	2,3±0,62	2,8±0,56	5,2±1,40
	14	9	3,3±1,06	4,0±1,31	3,4±0,92	3,1±0,76
	7	7	3,7±0,93	1,4±0,78	4,2±1,06	2,7±0,56
RPMI 1640	> 21	4	0,7±0,22	0,6±0,20	1,6±0,33	0,8±0,04
	21	6	1,6±0,51	0,4±0,26	2,8±0,52	0,8±0,06
	14	3	8,0±0,79	5,7±0,54	4,8±2,26	1,7±0,27
	7	7	3,6±0,69	1,2±0,02	2,3±0,85	1,2±0,12

(1,4±0,42 мВ/хв×0,1 мл СК) у BME. Різниця між мінімальною і максимальною величинами відновної здатності клітин становить 66,7% і статистично вірогідна ($p < 0,05$). Додавання до середовища акцептора електронів знижує на 61,6 - 66,7 % ($p < 0,01$) споживання кисню клітин. При цьому, відновна здатність залишається найвищою у DMEM (2,7±0,56 мВ/хв×0,1 мл СК), на 55,6 % нижчою у RPMI-1640 і найнижчою у BME (0,8±0,04 мВ/хв×0,1 мл СК). Отже, культивування гранульози 7 діб у середовищі DMEM найбільше стимулює потік електронів (протонів) з клітин і їх нагромадження у позаклітинному середовищі. Встановлене зниження інтенсивності споживання кисню, після додавання калію ферриціаніду, свідчить про існуючий дефіцит акцепторів електронів у культурі клітин, незалежно від складу середовищ.

За вказаної інтенсивності окисних процесів утворення прогестерону клітинами найвище в RPMI-1640 ($30,7 \pm 9,74$ нмоль/л), на 16,3% менше у DMEM і низьке у BME ($20,5 \pm 1,91$ нмоль/л; табл. 3. 47). Аналогічно, концентрація

Таблиця 3.47

Концентрація гормонів за культивування гранульози, $M \pm m$

Умови культивування		Концентрація гормонів, нмоль/л			
Середовище	Доба	n	Прогестерон	Естрадіол	Тестостерон
BME	> 21	18	$5,6 \pm 0,84$	$1,3 \pm 0,45$	$0,2 \pm 0,06$
	21	26	$27,4 \pm 6,38$	$4,6 \pm 0,81$	$0,6 \pm 0,08$
	14	9	$28,6 \pm 4,98$	$7,4 \pm 1,48$	$0,6 \pm 0,16$
	7	7	$20,5 \pm 1,91$	$8,2 \pm 0,64$	$0,2 \pm 0,04$
DME	> 21	18	$21,6 \pm 1,33$	$9,0 \pm 0,96$	$0,3 \pm 0,03$
	21	12	$11,3 \pm 4,54$	$19,1 \pm 4,88$	$0,5 \pm 0,04$
	14	9	$16,6 \pm 2,57$	$20,9 \pm 1,51$	$0,4 \pm 0,03$
	7	7	$25,7 \pm 5,27$	$5,1 \pm 2,03$	$0,2 \pm 0,08$
RPMI 1640	> 21	4	$6,9 \pm 0,74$	$0,3 \pm 0,03$	$0,4 \pm 0,21$
	21	6	$37,9 \pm 1,46$	$0,4 \pm 0,10$	$0,4 \pm 0,11$
	14	3	$56,7 \pm 1,21$	$4,6 \pm 0,79$	$0,1 \pm 0,01$
	7	7	$30,7 \pm 9,74$	$12,0 \pm 4,31$	$0,2 \pm 0,08$

естрадіолу найвища у RPMI-1640 ($12,0 \pm 4,31$ нмоль/л), на 31,7 % нижча у BME і найнижча у DMEM ($5,1 \pm 2,03$ нмоль/л). При цьому, концентрація тестостерону не залежить від дихальної активності та відновної здатності клітин гранульози і становить $0,2$ нмоль/л.

Після заміни 2/3 середовищ на 14 добу культивування, порівняно з 7 добою, інтенсивність окисних процесів у клітин у RPMI-1640 і BME зростає, а у DMEM проявляється тенденція до зниження. Зокрема, за культивування в RPMI-1640 гранульоза споживає на 55,0 % ($p < 0,001$) більше кисню і на 52,1 % зростає відновна здатність. Аналогічно, у BME клітини характеризуються вищими на 28,0 % дихальною активністю і на 74,6 % ($p < 0,01$) відновною

здатністю. У середовищі DMEM споживання кисню і відновна здатність клітин гранульози майже не змінюються і становлять, відповідно, $3,3 \pm 1,06$ нг-атом O/0,1 мл СК/ хв і $3,4 \pm 0,92$ мВ/0,1мл СК/ хв. Додавання акцептора електронів до культивованих 14 діб клітин, порівняно з 7 добовими, однозначно впливає на інтенсивність окисних процесів у культурі. Дихальна активність гранульози у середовищах ВМЕ, DMEM і RPMI-1640 зростає, відповідно, на 65,2 ($p < 0,001$), 65,0 і 79,0 % ($p < 0,001$). При цьому, підвищується й відновна здатність клітин: на 90,7% у ВМЕ ($p < 0,001$), на 13,0 % у DMEM і на 29,5 % у RPMI-1640. Таким чином, внесення калію ферриціаніду, як додаткового джерела акцептора електронів, забезпечує баланс між дихальною активністю та відновною здатністю клітин.

Зміни інтенсивності окисних процесів у гранульозі за культивування в RPMI-1640 проявляються на 45,9 % ($p < 0,05$) вищим синтезом прогестерону і на 61,7 та 50,0 % нижчим, відповідно, естрадіолу і тестостерону. Культивування гранульози в ВМЕ зумовлює зростання концентрацій прогестерону і тестостерону, відповідно, на 28,4 і 66,7 % ($p < 0,05$), а естрадіолу – майже не змінюється ($7,4 \pm 1,48$ нмоль/л). Клітини культивовані в DMEM проявляють нижчу на 35,5 % здатність утворювати прогестерон, однак, вищу на 75,6 ($p < 0,001$) - естрадіол і на 50,0 % ($p < 0,05$) - тестостерон. Таким чином, підвищення дихальної активності і відновної здатності гранульози стимулює утворення прогестерону та зниження естрадіолу і тестостерону, а активування одного зі шляхів утилізації акцептора (кисню чи $K_3[Fe(CN)_6]$) виявляє дисбаланс у синтезі стероїдних гормонів.

На 21 добу культивування, порівняно з 14 добою, споживання кисню гранульозою в середовищах знижується: ВМЕ – на 32,0 %, DMEM – на 42,5% і RPMI-1640 - на 80,0 % ($p < 0,001$). Аналогічно, відновна здатність клітин у вказаний період нижча на 25,5 % у ВМЕ, на 17,7 % - DMEM і на 41,7 % - RPMI-1640. Подібний результат отримано при вивченні дихальної активності у гранульозі за використання $K_3[Fe(CN)_6]$: вона знижується на 86,1 % ($p < 0,001$) у ВМЕ, на 42,5 % - DMEM і на 93,0 % ($p < 0,001$) - RPMI-1640. Аналогічно,

відновна здатність клітин нижча на 21 добу культивування, порівняно з 14 добою, на 76,8 % ($p < 0,001$) у ВМЕ і на 41,7 % ($p < 0,05$) в RPMI-1640, однак, в DMEM величина показника проявляє тенденцію до підвищення (на 40,4 %; $p > 0,05$). Отже, збільшення тривалості культивування до 21 доби однозначно призводить до зниження споживання кисню і відновної здатності клітин гранульози, незалежно від середовища культивування.

За виявлених змін окисних процесів на 21 добу культивування, порівняно з 14 добою, утворення прогестерону клітинами в ВМЕ і RPMI-1640 майже не змінюється (відповідно, $27,4 \pm 6,38$ і $37,9 \pm 1,46$ нмоль/л), а у DMEM - на 56,1 % знижується. При цьому, концентрація естрадіолу в DMEM не змінюється ($19,1 \pm 4,88$ нмоль/л), а в ВМЕ і RPMI-1640 - знижується, відповідно, на 37,9 і 91,4 % ($p < 0,001$). Одночасно, концентрація тестостерону в ВМЕ і DMEM однакові (відповідно, $0,6 \pm 0,08$ і $0,5 \pm 0,04$ нмоль/л), а у RPMI-1640 – зростає на 75,0 % ($p < 0,05$).

Культивування гранульози більше 21 доби, порівняно з аналогами 21 доби, призводить до зниження дихальної активності та відновної здатності у середовищах ВМЕ і RPMI-1640, відповідно, на 44,2 ($p < 0,05$) і 56,3 % та 36,6 ($p < 0,05$) і 42,9 %. У DMEM за вказаний період дихальна активність і відновна здатність клітин проявляють тенденцію до підвищення (відповідно, на 20,9 і 20,0 %; $p > 0,05$). При використанні акцептора електронів виявлено, що у клітин з середовищ ВМЕ та RPMI-1640 дихальна активність і відновна здатність не змінюються (відповідно, $1,0 \pm 0,36$ та $0,6 \pm 0,20$ нг-атом O/хв \times 0,1 мл СК і $2,1 \pm 0,68$ та $0,8 \pm 0,04$ мВ/хв \times 0,1 мл СК). Гранульоза, культивована більше 21 доби в DMEM, за дихальною активністю однакова з аналогами 21 доби ($2,0 \pm 0,37$ нг-атом O/хв \times 0,1 мл СК), а відновна здатність на 52,0 % ($p > 0,05$) знижується.

Культивування гранульози більше 21 доби, порівняно з аналогами 21 доби, характеризується пониженим синтезом прогестерону в ВМЕ і RPMI-1640, відповідно, на 79,6 і 90,6 % ($p < 0,001$), естрадіолу на 71,8 ($p < 0,001$) і 25,0 %. Концентрація тестостерону в ВМЕ зменшується на 66,7 % ($p < 0,001$), а в RPMI-1640 не змінюється ($0,4 \pm 0,21$ нмоль/л). У DMEM клітини зберігають

здатність синтезувати прогестерон, концентрація якого вища на 47,7 % ($p < 0,05$), а утворення естрадіолу і тестостерону знижується, відповідно, на 52,9 ($p < 0,01$) і 40,0 % ($p < 0,001$). Таким чином, причинами неоднозначних змін величин значень досліджуваних показників є склад середовищ культивування та метаболічна активність клітин: використання субстратів середовищ аеробним шляхом та інтенсивний транспорт електронів (протонів) і їх нагромадження у позаклітинному середовищі.

Для виявлення впливу субстратів на інтенсивність окисних процесів і утворення клітинами гормонів до середовищ культивування додавали натрію піруват. При цьому, додавання субстрату неоднозначно впливає на кількість клітин гранульози (табл. 3.48). За період інкубування (38 - 40 діб) в контролі

Таблиця 3.48

**Кількість клітин і активність ензимів енергетичного обміну
гранульози за балансування середовищ культивування піруватом, $M \pm m$**

Досліджувані показники	n	Вміст пірувату в середовищі, мг/л				η
		контроль	17	35	52	
RPMI-1640						
К-ть клітин, тис/мл	9	59,8±6,70	53,1±6,35	43,4±8,15	44,4±7,15	0,298
ЛДГ, нмоль/хв×мг	9	2,2±0,77	2,4±0,42	2,3±0,65	1,9±0,46	0,094
МДГ, нмоль/хв×мг	9	0,47±0,07	0,87±0,26	1,11±0,32	1,50±0,04	0,425
BME						
К-ть клітин, тис/мл	9	41,9±7,53	52,4±8,65	46,1±7,77	54,9±10,23	0,194
ЛДГ, нмоль/хв×мг	9	3,6±0,91	2,8±0,63	2,8±0,56	3,4±0,66	0,164
МДГ, нмоль/хв×мг	9	0,58±0,13	0,59±0,13	0,66±0,18	0,68±0,13	0,100

(RPMI-1640) величина значення 59,8±6,70 тис/мл і нижча за додавання пірувату: 17 мг/л - на 11,3 %, а за 35 і 52 мг/л, відповідно, на 27,5 і 25,8 %. Культивування гранульози в BME з 17 мг/л пірувату підвищує кількість клітин на 20,1%, 35 мг/л – на 9,2 % і 52 мг/л на 23,7%, порівняно з контролем.

Додавання 17 мг/л пірувату в RPMI-1640 забезпечує найвищу активність ЛДГ ($2,4 \pm 0,42$ нмоль/хв \times мг) гранульози. Збільшення пірувату (35 і 52 мг/л) у складі середовища знижує активність ензиму, порівняно з максимумом, на 4,2 і 20,9 %. В ВМЕ, при дозах 17 і 35 мг/л пірувату активність ЛДГ на 22,3 %, а при 52 мг/л - на 5,6 % нижчі, ніж в контролі. Одночасно піруват в наростаючих дозах (17, 35 і 52 мг/л) в RPMI-1640 пропорційно підвищує активність МДГ клітин гранульози, відповідно, на 46,0, 57,7 і 69,7 %, порівняно з контролем. Аналогічні зміни активності МДГ виявлені при додаванні пірувату до ВМЕ: за 17 мг/л пірувату вона на рівні контролю ($0,59 \pm 0,13$ нмоль/хв \times мг), а при 35 і 52 мг/л вища, відповідно, на 12,2 і 14,8 %.

Крім змін активності ензимів енергетичного обміну додавання пірувату впливає на ензиматичну ланку АОЗ гранульози. Так, інкубування клітин в RPMI-1640 з наростаючими дозами пірувату активує СОД, величина значення якої вища на 19,5 % при 17 мг/л субстрату, на 10,2 % при 35 мг/л і на 33,4 % при 52 мг/л, порівняно з контролем (табл. 3.49). При цьому, активність ГПО і

Таблиця 3.49

Активність ензимів антиоксидантного захисту клітин гранульози за балансування середовищ культивування піруватом, $M \pm m$

Досліджувані показники	n	Умови досліджу: вміст пірувату в середовищі культивування, мг/л				η
		контроль	17	35	52	
RPMI-1640						
СОД, МО/ мг білка	9	$6,2 \pm 1,30$	$7,7 \pm 1,46$	$6,9 \pm 1,28$	$9,3 \pm 2,47$	0,214
ГПО, мкмоль/хв \times мг білка	9	$0,29 \pm 0,06$	$0,26 \pm 0,04$	$0,26 \pm 0,04$	$0,27 \pm 0,04$	0,094
КАТ, мкмоль/хв \times мг білка	9	$0,75 \pm 0,13$	$0,59 \pm 0,10$	$0,59 \pm 0,14$	$0,61 \pm 0,09$	0,184
ВМЕ						
СОД, МО/ мг білка	9	$8,0 \pm 1,91$	$8,8 \pm 1,84$	$6,7 \pm 1,37$	$6,1 \pm 1,43$	0,207
ГПО, мкмоль/хв \times мг білка	9	$0,19 \pm 0,04$	$0,27 \pm 0,05$	$0,29 \pm 0,06$	$0,31 \pm 0,05$	0,294
КАТ, мкмоль/хв \times мг білка	9	$0,44 \pm 0,07$	$0,52 \pm 0,10$	$0,58 \pm 0,13$	$0,63 \pm 0,17$	0,184

КАТ знижуються, відповідно, на 10,4 і 21,4 % при дозі до 35 мг/л пірувату та на 6,7 і 18,7 % при дозі 52 мг/л. Іншу залежність виявлено при вивченні ензимів антиоксидантного захисту в культурі гранульози за інкубування в ВМЕ з піруватом. Активність СОД клітин за 17 мг/л пірувату в середовищі підвищується на 10,0 %, а за 35 і 52 мг/л знижується, відповідно, на 16,3 і 23,8 %, порівняно з контролем. Активність ензимів гранульози, які перетворюють H_2O_2 зі збільшенням дози пірувату в ВМЕ зростає: ГПО на 29,7 % за дози 17 мг/л, на 34,5% - за 35 мг/л і на 38,8 % - за 52 мг/л, порівняно з контролем. Аналогічна залежність виявлена при дослідженні КАТ: активність ензиму вища на 15,4 % за дози пірувату 17 мг/л, на 24,2 % за 35 мг/л і на 30,2 % - за 52 мг/л, порівняно з контролем.

Одночасно, за культивування гранульози в RPMI-1640 концентрація естрадіолу в культурі клітин $2,1 \pm 0,62$ нмоль/л, а за додавання 17 мг/л пірувату зростає на 32,3 % (табл. 3.50). Збільшення дози пірувату до 35 і 52 мг/мл

Таблиця 3.50

Концентрація гормонів у культурі клітин гранульози за балансування середовищ культивування піруватом, нмоль/л, $M \pm m$

Концентрація гормонів, нмоль/л	n	Вміст пірувату в середовищі, мг/л				η
		контроль	17	35	52	
RPMI-1640						
Естрадіол	12	$2,1 \pm 0,62$	$3,1 \pm 1,06$	$1,9 \pm 0,67$	$1,7 \pm 0,62$	0,369
Прогестерон	12	$3,3 \pm 1,07$	$3,4 \pm 1,65$	$5,1 \pm 1,63$	$5,2 \pm 0,62$	0,274
Тестостерон	12	$0,003 \pm 0,0001$	$0,003 \pm$	-	-	-
ВМЕ						
Естрадіол	12	$2,5 \pm 1,08$	$2,4 \pm 0,67$	$3,2 \pm 1,23$	$2,3 \pm 0,77$	0,214
Прогестерон	12	$7,3 \pm 2,42$	$5,7 \pm 2,03$	$5,4 \pm 1,44$	$6,6 \pm 1,92$	0,214
Тестостерон	12	$0,003 \pm 0,0001$	$0,003 \pm$	$0,003 \pm$	$0,003 \pm$	-

знижує утворення естрадіолу, відповідно, на 9,4 і 19,1%, порівняно з контролем. Концентрація прогестерону в контролі і при додаванні 17 мг/л

пірувату не змінюється (3,3 – 3,4 нмоль/л), а при дозах 35 і 52 мг/л зростає, відповідно, на 35,3 і 36,6 %. Концентрація тестостерону в культурі клітин за додавання 35 і 52 мг/л пірувату знижується до недетектабельних величин, а в контролі і при додаванні 17 мг/л пірувату в RPMI-1640 становить $0,003 \pm 0,0001$ нмоль/л.

За інкубування гранульози в ВМЕ без- та з додаванням 17 мг/л пірувату концентрація естрадіолу однакова (2,4 -2,5 нмоль/л), за 35 мг/л зростає на 11,9 % і при 52 мг/л знову знижується до рівня контролю ($2,3 \pm 0,77$ нмоль/л). Утворення прогестерону клітинами гранульози за культивування в ВМЕ понижене в присутності пірувату (17 - 32 мг/л) і становить 5,4 - 5,7 нмоль/л, вище на 18,2% за дози 52 мг/л. Максимальна концентрація прогестерону ($7,3 \pm 2,42$ нмоль/л) встановлена в середовищі ВМЕ без пірувату. Концентрація тестостерону незалежно від присутності пірувату в середовищі ВМЕ однакова і становить 0,003 нмоль/л.

Отже, утворення естрадіолу стимулюється ($\eta = 0,369$) культивуванням гранульози у середовищі RPMI-1640 з 17 мг/л пірувату впродовж 38 - 40 діб, а у середовищі ВМЕ - з 35 мг/л. Одночасно, інтенсивність синтезу прогестерону гранульозою зростає зі збільшенням дози пірувату в обох середовищах і досягає максимуму при 52 мг/л пірувату, а концентрація тестостерону не залежить від дози субстрату. Максимально високий синтез естрадіолу ($3,1 \pm 1,06$ нмоль/л) клітинами гранульози в RPMI-1640 з додаванням 17 мг/л пірувату проявляється за високої активності ЛДГ ($2,4 \pm 0,42$ нмоль/хв×мг протеїну), а прогестерону ($5,2 \pm 0,62$ нмоль/л) - за МДГ ($1,50 \pm 0,04$ нмоль/хв×мг протеїну; $\eta = 0,425$). У середовищі ВМЕ з піруватом за підвищення активності МДГ проявляється тенденція до зростання інтенсивності синтезу прогестерону. Додавання в середовища культивування пірувату зумовлює в гранульозі за інкубування в RPMI-1640 підвищення активності СОД і зниження ГПО та КАТ, а в ВМЕ - зростання активності ГПО і КАТ та зниження СОД.

Ще одним фактором, який визначає інтенсивність окисних процесів і утворення стероїдних гормонів гранульози є пасажування культури клітин. Так,

активність СОД у вихідній (первинній) культурі з фолікулів яєчника «фолікулярного росту» - $27,5 \pm 1,50$ МО/мг протеїну (табл. 3.51). Після першого

Таблиця 3.51

Активність ензимів АОЗ клітин гранульози при пасажуванні, $M \pm m$

Культура клітин за фізіологічного стану яєчника		Активність ензимів			
		n	СОД, МО/мг протеїну	КАТ, мкмоль/ хв×мг протеїну	ГПО, мкмоль/ хв×мг протеїну
«фолікулярний ріст»	III пасаж	3	$23,1 \pm 2,53$	$2,03 \pm 0,21$	$0,88 \pm 0,18$
	II пасаж	4	$19,6 \pm 2,03$	$1,65 \pm 0,32$	$0,75 \pm 0,11$
	I пасаж	4	$29,0 \pm 2,45$	$1,26 \pm 0,24$	$0,64 \pm 0,08$
	первинна	4	$27,5 \pm 1,50$	$1,33 \pm 0,45$	$0,75 \pm 0,07$
«пізні жовте тіло»	III пасаж	3	$12,5 \pm 3,19$	$1,29 \pm 0,47$	$0,62 \pm 0,05$
	II пасаж	5	$20,2 \pm 3,45$	$1,64 \pm 0,52$	$0,85 \pm 0,01$
	I пасаж	5	$37,4 \pm 6,15$	$1,89 \pm 0,52$	$0,76 \pm 0,06$
	первинна	5	$39,2 \pm 2,90$	$1,04 \pm 0,38$	$0,67 \pm 0,10$

пасажу активність ензиму майже не змінюється ($29,0 \pm 2,45$ МО/мг протеїну), а після другого і третього знижується на 28,8 ($p < 0,05$) і 16,0 %. Активність КАТ у первинній культурі та після першого пасажу майже однакова ($1,26 - 1,33$ мкмоль/хв ×мг протеїну) і підвищується після другого та третього, відповідно, на 19,4 і 34,5 %. Аналогічно, активність ГПО у культурі клітин - первинній, першого і другого пасажів майже однакова й знаходиться в межах $0,64 - 0,75$ мкмоль/хв×мг білка, а після третього пасажу зростає на 14,8 - 24,8 %. У первинній культурі гранульози з фолікулів яєчника «пізнього жовтого тіла» активність СОД $39,2 \pm 2,90$ МО/мг протеїну і знижується за пасажування: першого – на 4,6 %, другого – 48,5 % ($p < 0,01$) і третього – 68,2 % ($p < 0,001$). На противагу, активність ензимів, що утилізують H_2O_2 після першого і другого пасажів, порівняно з первинною культурою, зростає: КАТ, відповідно, на 45,0 і 36,4 % і ГПО – на 11,9 і 21,2 %. За третього пасажу активність КАТ залишається вищою на 19,4 %, а ГПО – нижча на 7,5 %, порівняно з первинною

культурою. Таким чином, пасажування клітин гранульози супроводжується зниженням активності СОД ($p < 0,05$ - другого пасажу з яєчника «фолікулярного росту»; $p < 0,01$ - другого і $p < 0,001$ - третього пасажу яєчника «пізнього жовтого тіла») та підвищенням КАТ і ГПО.

За змін активності ензимів антиоксидантного захисту виявлено, що первинна культура клітин через 14 діб характеризується концентраціями (нмоль/л): естрадіолу - 24,8 - 26,1, прогестерону - 45,7 - 45,9 і тестостерону - 1,8 - 2,2 (табл. 3.52). Через 14 діб клітини I пасажу з яєчника «фолікулярного

Таблиця 3.52

Концентрація статевих гормонів у середовищі культивування при пасажуванні гранульози, нмоль/л

Культура клітин за стану яєчника		Естрадіол		Прогестерон		Тестостерон	
		n	M±m	n	M±m	n	M±m
«фолікулярний ріст»	III пасаж	23	9,4±1,30	20	36,5±8,92	23	1,4±0,25
	II пасаж	4	21,5±3,68	3	43,7±23,90	4	1,7±0,32
	I пасаж	17	13,6±2,29	15	35,4±9,65	17	1,6±0,27
	первинна	4	26,1±4,74	3	45,7±22,70	4	1,8±0,37
«пізнє жовте тіло»	III пасаж	3	22,6±5,17	3	83,1±11,10	3	2,3±0,58
	II пасаж	3	20,6±7,79	3	51,1±34,54	3	1,7±0,19
	I пасаж	5	25,9±3,22	3	43,9±16,92	5	2,0±0,37
	первинна	4	24,8±4,28	3	45,9±22,82	4	2,2±0,34

росту» утворювали менше на 47,9 % ($p < 0,05$) естрадіолу, на 22,6 % прогестерону і на 11,2 % тестостерону, порівняно з вихідною культурою. Гранульоза II пасажу також відрізняється від первинної культури. Проте, різниця менша, порівняно з I пасажем і становить 17,7% за естрадіолом, 4,4 % - прогестероном і 5,4 % - тестостероном. При III пасажі клітини гранульози синтезують менше на 64,0 % ($p < 0,01$) естрадіолу, на 20,2 % прогестерону і на 22,3 % тестостерону. Таким чином, при першому і другому пасажах клітини гранульози фолікулів яєчника «фолікулярного росту» зберігають здатність

синтезувати гормони, а при третьому пасажі – інтенсивність синтезу естрадіолу вірогідно нижча ($p < 0,01$), порівняно з первинною культурою клітин.

При I пасажі гранульози з фолікулів яєчника «пізнього жовтого тіла» утворення гормонів не змінюється і становить (нмоль/л): естрадіолу - $25,9 \pm 3,22$, прогестерону - $43,9 \pm 16,92$ і тестостерону - $2,0 \pm 0,37$. За II пасажу в клітин гранульози, порівняно з первинною культурою, проявилась тенденція до зниження синтезу на 16,9% естрадіолу і на 22,8% тестостерону та зростання на 10,2% прогестерону. За III пасажу концентрація естрадіолу, порівняно з II пасажем, майже не змінилась ($22,6 \pm 5,17$ нмоль/л) та підвищились концентрації на 26,1% тестостерону і на 38,6% прогестерону.

Отже, пасажування клітин гранульози супроводжується зниженням активності СОД та підвищенням КАТ і ГПО. При цьому, за першого і другого пасажів клітини гранульози фолікулів з досліджених фізіологічних станів яєчника зберігають здатність синтезувати гормони, а при третьому пасажі – гранульоза з фолікулів статевої залози «фолікулярного росту» знижує синтез естрадіолу ($p < 0,01$), а з «пізнього жовтого тіла» зростає інтенсивність утворення прогестерону.

Результати досліджень підрозділу опубліковані у статті [308].

3.8. Апробування ефективності ветеринарного препарату на основі середовища культивування клітин гранульози. Економічна ефективність використання препарату «Фоліген»

Суміш середовищ культивування 7 і 14 добових культур клітин гранульози фолікулів яєчників корів з концентрацією статевих гормонів (тестостерону, естрадіолу і прогестерону) послужило сировиною для виготовлення препарату зі стимулювання відтворної функції корів – умовна назва «Фоліген». Для виготовлення препарату попередньо визначили концентрацією статевих гормонів, яка становила (нмоль/л): тестостерону - 0,2 -

2,0, естрадіолу - 11 - 20 і прогестерону - 30 - 45. Препарат містив рівні об'єми середовища культивування і ліпосомальної емульсії (50/50).

Для проведення досліджень, за первинними записами обліку осіменіння на пункті штучного осіменіння і за проведеними ректальними дослідженнями, відібрано 50 корів, які після отелу не приходили більше 2 місяців в охоту з діагнозом гіпофункція яєчників. Тварин поділили на дві групи: контрольну (n = 10 гол.) – стимулювали репродуктивну функцію «Естрофаном» відповідно до інструкції виробника і дослідну (n = 40 гол.) – застосовували виготовлений препарат у дозі 10 мл на тварину. У випадку відсутності феноменів статевого циклу після однократного введення «Фолігену» через 10-12 діб повторно вводили ще 10 мл препарату.

В результаті використання препарату, після першого введення, в охоту прийшли 14 корів (35,0 %), а після повторного - ще 16 голів (40,0 %). Тобто, від використання розробленого препарату на основі середовища культивування гранульози із 40 корів прийшли в охоту 30 голів, були осіменені і через 2 міс, на основі ректальних досліджень, діагностована тільність. Використання «Естрофану» забезпечило відновлення статевого циклу в 4 голів (40,0 %) із 10 простимульованих корів та, після штучного осіменіння, їх запліднення. Отже, після двократного введення препарату «Фоліген» 30 корів (75,0 %) прийшли в охоту і на основі ректальних досліджень встановлена тільність, а при використанні «Естрофану» тільки у 4 голів (40,0 %). Таким чином, використання розробленого препарату ефективніше на 35,0 %, порівняно з існуючою (традиційною) схемою стимулювання репродуктивної функції корів.

При аналізі економічної ефективності застосування препарату «Фоліген» враховували витрати на його виготовлення, кратність введення та приріст ефективності, порівняно з використанням «Естрофану». «Естрофан» вводили коровам у дозі 2 мл двократно через 10 - 12 діб (24 грн. вартість однієї дози×два рази = 48 грн) – вартість лікування 1 голови. Вартість виготовлення препарату «Фоліген» включає ціну на середовище культивування (RPMI-1640 – 500 грн на 1 л деіонізованої води) та компоненти для виготовлення 0,5 л ліпосомальної

емульсії (250 грн). Крім того, для отримання середовища з максимальною концентрацією гормонів культивували клітини гранульози 14 діб при температурі 37°C при затратах електроенергії (1,25 грн за кВт/год \times 24 год = 30 грн \times 14 діб культивування) 420 грн. Отже, для виготовлення 1 л препарату «Фоліген» при співвідношенні компонентів (середовище культивування 50 % і ліпосомальна емульсія 50%) необхідно (250 грн + 250 грн + 420 грн.) 920 грн. З урахуванням однократного введення препарату - 10 мл, з виготовленого об'єму (1 л) отримали 100 доз «Фолігену» вартістю 920 грн, а ціна однієї дози (920:100), відповідно, 9,2 грн. Таким чином, порівняння цінової складової «Естрофану» і «Фолігену» - вартість однієї дози розробленого препарату нижча на 14,8 грн. Відповідно, при однаковій кратності введення (2-х разового) препаратів, відновлення статевої функції однієї корови препаратом «Фолігеном» буде дешевше на 29,6 грн.

РОЗДІЛ 4.

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Клітини гранульозного шару вистилають внутрішню поверхню фолікула та оточують ооцит, формуючи навколо нього яйценосний горбик [309]. Їх метаболізм визначається роллю у дозріванні яйцеклітини - ступенем зрілості цитоплазми і ядра. За природних умов на метаболізм у фолікулах яєчників самок, у тому числі й гранульози, впливає інтенсивність постачання кисню з кров'ю і доступність субстратів [310]. Крім того, відповідно до дії гонадотропних гормонів, а також потреб ооцита, у гранульозі змінюється інтенсивність використання субстратів, утворення біологічно активних речовин, їх продукція *in vivo* у фолікулярну рідину та *in vitro* в середовища культивування [311, 312, 313].

З результатів досліджень випливає, що одною з причин, яка визначає як інтенсивність окисних процесів, так і утворення гормонів клітинами гранульози є тривалість культивування. Так, динаміка інтенсивності окисних процесів впродовж культивування гранульози свідчить, що незалежно від складу середовищ, зі збільшенням часу культивування до 14 діб дихальна активність і відновна здатність клітин зростають, а потім - знижуються. При цьому, за високих величин дихальної активності і відновної здатності клітин гранульози зростає синтез прогестерону і знижується утворення естрадіолу. Крім цього, на величини значень досліджуваних показників впливає склад середовищ культивування та метаболічна активність клітин: використання субстратів середовищ аеробним шляхом та інтенсивний транспорт електронів (протонів) і їх нагромадження у позаклітинному середовищі.

Також на здатність синтезувати гормони впливає кількість пасажів культури клітин. Так, за першого і другого пасажів гранульоза з фолікулів яєчника «фолікулярного росту» зберігає здатність утворювати стероїдні гормони, а при третьому – синтез естрадіолу знижується ($p < 0,01$). Аналогічно,

клітини з фолікулів яєчника «пізнього жовтого тіла» при пасажуванні здатні синтезувати гормони, а при третьому пасажі зростає утворення прогестерону.

Відомо, що клітини гранульози здатні використовувати субстрати в анаеробних умовах гліколізом, а за присутності кисню ресинтезувати АТФ у мітохондріях [12, 314, 315, 316]. Встановлено, що дихальна активність і відновна здатність клітин залежать від фізіологічного стану яєчників з яких вилучені гранульоза. Ймовірною причиною відмінності окисних процесів в клітинах є вплив гонадотропних гормонів (чи його відсутність) і забезпеченість субстратами організму корови *in vivo* та пролонгований вплив вказаних чинників за культивування *in vitro* [317, 318, 319]. Одночасно виявлено, що транспорт електронів пов'язаний з стероїдогенезом, на додаток до мітохондріального метаболізму, що характеризує важливі шляхи утворення вільних радикалів в стероїдогенно активних клітинах, таких як гранульоза антральних фолікулів [320, 321, 322].

Крім того, дихальна активність і відновна здатність клітин залежать від стадії розвитку фолікулів одного і того ж фізіологічного стану яєчника. Проведений аналіз кореляцій між досліджуваними показниками свідчить про неоднозначні сили і напрямки зв'язків між інтенсивністю окисних процесів й синтезом стероїдних гормонів клітинами гранульози. Зокрема, встановлені середньої сили залежності концентрації тестостерону (позитивна; $\eta = 0,472$) і прогестерону (криволінійна, з максимумом при 3,1 - 4,0 нг-атом O/0,1 мл СК/ хв; $\eta = 0,368$) з дихальною активністю клітин вказують на участь окисних процесів в утворенні гормонів гранульозою. Інтенсивний обмін між клітинами і середовищем культивування (без акцептора електронів), відтік відновних еквівалентів з гранульози призводить до втрат ендогенних субстратів (чи їх окиснення) і характеризує зниження утворення тестостерону ($\eta = 0,619$) і естрадіолу ($\eta = 0,466$). Ця залежність підтверджується за присутності калію ферриціаніду у середовищі, який конкурує з киснем за електрони: відтік електронів з мітохондрій (цитозоллю) клітин за культивування призводить до зниження, як дихальної активності, так і утворення статевих гормонів

культурою гранульози, зокрема, тестостерону та естрадіолу (негативна, відповідно, $\eta = 0,394$ і $0,348$). Ще одним підтвердженням є залежність відновної здатності клітин за присутності позаклітинного акцептора - зниження утворення тестостерону і естрадіолу (відповідно, $\eta = 0,401$ і $0,429$). На відміну, за вказаних умов характерним є підвищення прогестерону ($\eta = 0,385$).

Зниження інтенсивності споживання кисню, після додавання калію ферриціаніду, свідчить про існуючий дефіцит акцепторів електронів у культурі клітин, незалежно від складу середовищ (DMEM, RPMI-1640 і BME), а калій ферриціанід, як додаткове джерело акцептора електронів, забезпечує баланс між дихальною активністю та відновною здатністю клітин.

Про значення аеробного метаболізму, зокрема гліколізу, і постачання субстратів в ЦТК для утворення гранулозою стероїдних гормонів, свідчать результати культивування клітин за присутності наростаючих доз пірувату. Утворення естрадіолу стимулюється ($\eta = 0,369$) культивуванням гранульози у середовищі RPMI-1640 з 17 мг/л пірувату впродовж 38 - 40 діб, а у BME - з 35 мг/л. Інтенсивність синтезу прогестерону гранулозою зростає зі збільшенням дози пірувату в обох досліджених середовищах і досягає максимуму при 52 мг/л пірувату. Слід зауважити, що концентрація тестостерону не залежить від дози пірувату в середовищах культивування.

Про здатність використовувати цукри та інтенсивний гліколіз в клітинах, в тому числі, й аеробний його шлях, свідчить активність ЛДГ ($1,7 \pm 0,44$ – $2,2 \pm 0,30$ мкмоль/хв \times мг білка), величина значень якої залежить як від фізіологічного стану яєчника, так і розміру фолікулів з яких вилучена гранульоза. Отримані результати узгоджуються з дослідженнями про здатність клітин гранульози утворювати піруват за культивування [52, 323]. Однак, нами не виявлено змін активності ЛДГ клітин при балансуванні (додаванні) натрієм піруватом середовищ культивування. Очевидно, це зумовлено присутністю в середовищах культивування глюкози і переважаючим її вмістом. В клітинах гранульози активність ензиму проявляється 5 ізозимами. Подібні результати отримані при дослідженні крові й тканин тварин, в яких встановлено основні

каталітично активні протеїни ензиму: ЛДГ1, ЛДГ2, ЛДГ3, ЛДГ4 і ЛДГ5 [324, 325].

Відомо, що вміст ізозимів ЛДГ характеризує напруженість енергетичного метаболізму в клітинах і пріоритети використання цукрів анаеробним чи аеробним шляхами ресинтезу АТФ. Перші два ізозими (ЛДГ1 і ЛДГ2) мають більшу спорідненість до лактату, тому переважають у тканинах, які добре забезпечуються киснем. ЛДГ3 має однакову спорідненість як до пірувату, так і до лактату, а ЛДГ4 та ЛДГ5 домінують у тканинах, де переважає гліколіз [326]. Отже, клітини гранульози вилучені з фолікулів яєчників фізіологічних станів «пізнього жовтого тіла» і «фолікулярного росту» за культивування більшою мірою перетворюють лактат в піруват, зі стимулюванням активності ЦТК та мітохондріального дихання (ЛДГ1+ЛДГ2 – 44,1 - 45,1 % проти ЛДГ4+ЛДГ5 – 35,2 – 36,0 %), а зі «свіжої овуляції», навпаки, переважає анаеробний гліколіз з нагромадженням лактату (ЛДГ4+ЛДГ5 - 45,4 % проти ЛДГ1+ЛДГ2 – 38,0 %). Отримані результати узгоджуються з твердженням про залежність активності й вмісту ізозимів ЛДГ від інтенсивності процесів окисного метаболізму і впливу різноманітних чинників на клітини [56, 327].

Встановлені залежності концентрацій гормонів від ЛДГ свідчать, що підвищення активності ензиму негативно впливає на утворення клітинами тестостерону ($\eta = 0,378$), що зумовлено зростанням вмісту ЛДГ1 – ЛДГ3 і, відповідно, перетворенням лактату в піруват (ЛДГ1 - $\eta = 0,635$, ЛДГ2 - $\eta = 0,319$ і ЛДГ3 - $\eta = 0,600$). Подібна тенденція проявляється й з естрадіолом, однак існує оптимум активності ензиму (1,0 – 2,0 мкМ / хв×мг протеїну) для якого характерна максимальна концентрація вказаного гормону ($12,1 \pm 5,40$ нмоль/л). Ймовірно, така залежність визначається співвідношенням між ізозимами ЛДГ, про що свідчить переважаюча сила кореляції ЛДГ5 ($\eta = 0,318$), над іншими ізозимами ($\eta = 0,210 - 0,284$). На противагу, активування ЛДГ позитивно впливає на утворення прогестерону ($\eta = 0,331$) і вказана залежність проявляється при зниженні перетворення лактату в піруват (ЛДГ1 – ЛДГ3 - $\eta = 0,313 - 0,335$).

Постачання субстратів, зокрема пірувату, в мітохондрії стимулює активність ЦТК. Поряд з цим відомо, що активність ЛДГ впливає на використання і постачання субстратів у мітохондрії шляхом підтримання рівня НАДН у цитозолі та забезпечення активності цитозольної МДГ [328]. Про взаємодію вказаних ензимів свідчить активність МДГ, яка становить $1,0 \pm 0,06$ мкмоль /хв×мг білка. Виявлено, що активність ензиму клітин гранульози залежить від присутності натрію пірувату в середовищах культивування: пропорційне збільшення вмісту субстрату призводить до підвищення активності МДГ ($\eta = 0,425$) в RPMI-1640.

Активність МДГ в культурі гранульози проявляється 5 ізозимами, які характеризуються різною рухливістю в електричному полі, а смуги окремих протеїнів на фореграмах проявляються не однаковою площею. Встановлені відмінності вмісту окремих ізозимів у гранульозі зумовлені як фізіологічним станом яєчників корів, так і розміром фолікулів з яких отримані клітини. Відомо, що збільшення активності і поява нових (чи відсутність окремих) ізозимів МДГ свідчить про участь малатдегідрогеназної системи в адаптивній реакції організму за стресових умов і визначає її поліморфізм [329]. Отже, клітини гранульози неоднозначно здатні пристосовуватись до умов культивування *in vitro*.

Оскільки МДГ1 цитозольний, а МДГ5 мітохондріальний ізозими [330, 331, 332], тоді інтенсивність перетворення оксалоацетату в малат у клітинах з яєчника «свіжої овуляції» понижена (МДГ1 — 5,9 %), порівняно з «фолікулярним ростом» (17,3 %). Аналогічно, інтенсивне використання малату в ЦТК мітохондрій клітин з яєчника «фолікулярного росту» (МДГ5 — 31,2 %) передбачає зростання дихальної активності мітохондрій і ресинтез АТФ, на відміну від гранульози з фолікулів статевої залози «свіжої овуляції» (13,9 %). Тобто, вміст ізозимів МДГ, залежно від розміру фолікула і з урахуванням фізіологічного стану яєчника, характеризує особливості окисного метаболізму клітин гранульози за культивування. Зокрема, у клітин з великого (домінуючого) фолікула яєчника «фолікулярного росту» переважає постачання

малату з цитозоллю в мітохондрії (МДГ1 - 19,4 %), включення в ЦТК та інтенсивне його перетворення в оксалоацетат (МДГ5 – 37,9 %). При цьому, перебіг процесів постачання з цитозоллю в мітохондрії малату чи відтік з мітохондрій субстратів корелює зі здатністю утворювати гормони клітинами гранульози.

Встановлена сильна позитивна кореляція активності МДГ з концентраціями тестостерону і естрадіолу (відповідно, $\eta = 0,700$ і $0,802$) підтверджує роль субстратів й ресинтезу АТФ в мітохондріях для утворення гормонів гранульозою. Крім того, зростання активності МДГ за додавання натрію пірувату до середовищ культивування (RPMI-1640 і BME), спричиняє підвищене утворення прогестерону клітинами ($5,2 \pm 0,62$ нмоль/л), яке проявляється за максимальної МДГ ($1,50 \pm 0,04$ нмоль/хв \times мг; $\eta = 0,425$) у RPMI-1640.

Про значення перетворення оксалоацетату і утворення малату для синтезу гормонів свідчить позитивна кореляція вмісту МДГ1 і МДГ5 з концентраціями тестостерону ($\eta = 0,529$ і $0,522$), естрадіолу ($\eta = 0,399$ і $0,397$) і прогестерону ($\eta = 0,487$ і $0,342$). Однак, збільшення вмісту МДГ3 неоднозначно впливає на концентрації тестостерону, яка знижується ($\eta = 0,440$) та естрадіолу – проявляє максимальну величину ($16,4 \pm 3,80$ нмоль/л) за 20,0 – 40,0 % ізоциму ($\eta = 0,435$). Подібна неоднозначна залежність від вмісту МДГ4 проявляється для концентрації тестостерону, максимальна величина якого ($3,7 \pm 1,48$ нмоль/л; $\eta = 0,307$) виявлена за 10,0 – 20,0 % ізоциму. Тобто, аналіз кореляцій свідчить про існування балансу між перетворенням оксалоацетату в цитозолі і постачанням малату в мітохондрії та відтоком субстратів з органел у цитозоль, що своєю чергою впливає на утворення стероїдних гормонів клітинами гранульози.

Оскільки встановлено, що генеровані вільні радикали Оксигену у мітохондріях ($O_2^{\cdot-}$) за участі потенціал-залежних аніонних каналів (VDAC) транспортуються через мембрану в цитозоль в клітинах виникає каскад неконтрольованих процесів окиснення [333]. Відомо, що комплекси I і III

дихального ланцюга мітохондрій генерують $O_2^{\bullet-}$. При цьому, в процесі переносу електронів комплекс I продукує $O_2^{\bullet-}$ на матричній поверхні мембрани мітохондрій, а комплекс III як на матричній поверхні, так і в міжмембранному просторі, приблизно в рівних кількостях [334, 335, 336]. Причиною ж підвищеного утворення $O_2^{\bullet-}$ є гальмування транспорту електронів у дихальному ланцюзі і зворотній їх транспорт з ФАД- (сукцинату) до НАД- залежної ланки [337, 338, 339, 340]. Крім того, $O_2^{\bullet-}$ в клітинах гранульози утворюються в процесі стероїдогенезу, надлишок яких пригнічує активність цитохрому P_{450sc} , транспорт і перетворення холестерину в мітохондріях в прегненолон [341, 342]. Чим більше в мітохондріях цитохром P_{450sc} перетворює холестерин в прегненолон, тим більше генерується АФО, як побічних продуктів [76, 343].

Утворення в дихальному ланцюзі мітохондрій і процесі стероїдогенезу вільних радикалів Оксигену призводить до активування ензимів антиоксидантного захисту [344, 345, 346]. При цьому, окиснювальний стрес, який виникає за нагромадження вільних радикалів зумовлює компенсаторне підвищення в клітинах активності СОД [309]. Встановлена неоднозначна активність СОД в культурі клітин залежно від фізіологічного стану і розміру фолікулів свідчить про різну фізіологічну якість гранульози і, відповідно, здатність утворювати гормони. З аналізу кореляцій випливає, що активування СОД і, відповідно, зростаюче утворення $O_2^{\bullet-}$, проявляється підвищенням концентрації тестостерону ($\eta = 0,306$) і слабо впливає на естрадіол та прогестерон ($\eta = 0,244 - 0,247$).

У клітинах ссавців активність СОД забезпечують ізозими, які, залежно від місця локалізації, поділяють на цитозольну (Cu,Zn-СОД), мітохондріальну (Mn-СОД) і позаклітинну (ES-СОД) СОД [85, 90, 347, 296]. В культурі клітин гранульози встановлено 5 - 6 смуг активних протеїнів СОД, різних за площами і, відповідно, вмістом, що залежить як від фізіологічного стану яєчника, так й розміру фолікулів з яких вилучені клітини. Зона рухливості Cu,Zn-СОД клітин представлена, в основному, трьома смугами протеїнів S1, S2 і S3. Крім того, в культурі гранульози з яєчника «фолікулярного росту» проявляється

додатковий, найбільш рухливий в електричному полі S0-ізозим Cu,Zn-СОД. Про посттрансляційні зміни, появу «нових» ізозимів СОД та коливання їх вмісту за дії різних чинників (гіпероксигенації, опромінення різних типів клітин) повідомляють й інші автори [348, 349, 350, 351, 352, 353, 296]. В зоні рухливості мітохондріальної та позаклітинної СОД виявлено по одній смузі протеїнів ензиму, відповідно, S4 і S5.

Із аналізу вмісту ізозимів випливає, що культура гранульози з яєчника «фолікулярного росту» здатна захищати внутрішньоклітинні компоненти від $O_2^{\cdot-}$ й ефективно їх перетворювати, а нагромадження супероксиданіону в мітохондріях низьке. За культивування гранульози з фолікулів яєчників «пізнього жовтого тіла» у клітин існує підвищена генерація і нагромадження супероксиданіону в цитозолі і позаклітинному просторі й, відповідно, потреба захищати як внутрішньоклітинні органели, так і зовнішню поверхню мембрани. Встановлена особливість, можливо, зумовлена фізіологічними характеристиками статевої залози та інгібуванням росту фолікулів (ооцитів) за впливу жовтого тіла. Подібно, для клітин з «раннього жовтого тіла» - як низька здатність перетворювати $O_2^{\cdot-}$ в цитозолі, так і надмірне його утворення в мітохондріях, ймовірно, визначені впливом ростучого жовтого тіла та зростанням концентрації прогестерону *in vivo*, спрямованістю біохімічних процесів на гальмування оогенезу. Для клітин з яєчника «свіжої овуляції» характерне порушення балансу між вмістом окремих ізозимів СОД, що визначено, можливо, дією гонадотропних гормонів на метаболічні процеси ще до вилучення гранульози з фолікулів. Припущення підтверджується дослідженнями якими виявлено, що *in vivo*, після стимулювання гонадотропінами росту домінуючого, гальмується ріст менших за розміром фолікулів, знижується синтез естрадіолу і відбуваються апоптичні зміни в клітинах гранульози [354].

Одночасно вміст ізозимів СОД характеризує інтенсивність утворення статевих гормонів клітинами, що зумовлено їх локалізацією і здатністю знижувати (нормалізувати) рівень $O_2^{\cdot-}$, що, своєю чергою, захищає від

неконтрольованого вільнорадикального окиснення субстратів - компонентів гормонів. Зокрема, зі збільшенням вмісту цитозольних та мітохондріальних ізоформ СОД зростає концентрація тестостерону: S2 (позитивна; $\eta = 0,715$) і S3 (криволінійна; з максимумом $5,1 \pm 0,85$ нмоль/л за менше 15,0 %; $\eta = 0,629$). Вказана залежність, ймовірно, зумовлена контролем Cu,Zn-СОД ізоформ (їх вмістом і, відповідно, активністю) нагромадження $O_2^{\bullet-}$ і окиснення ліпідів в цитозолі з надходженням субстратів (холестеролу) для синтезу тестостерону в мітохондрії. Однак, за максимальних величин вмісту Mn-СОД (більше 40,0 %) утворення гормону гальмується і концентрація тестостерону низька ($0,9 \pm 0,31$ нмоль/л), що вказує на існування у клітинах оптимальних рівнів інтенсивності як нагромадження $O_2^{\bullet-}$, так і його перетворення. Подібно до залежності концентрації тестостерону, зростання вмісту Cu,Zn-СОД забезпечує ($\eta = 0,343 - 0,460$) вплив на утворення інших гормонів: S1- прогестерону, S2- естрадіолу, S3 - обох гормонів. Одночасно, вміст Mn-СОД проявляє криволінійну залежність з концентрацією естрадіолу ($\eta = 0,347$), максимальне значення якого ($10,9 \pm 3,80$ нмоль/л) проявляється за 30,0 – 40,0 % ізоформу.

Відомо, що естрадіол здатний інгібувати СОД1 та мРНК Mn-СОД, а Cu,Zn-СОД пригнічує утворення прогестерону [355]. Встановлені сили кореляцій для естрадіолу ще раз підтверджують постулат, що для перебігу розщеплення субстратів (ліпідів), які використовуються (холестерол) для синтезу гормону необхідний зростаючий і контрольований рівень утворення $O_2^{\bullet-}$ в цитозолі (S2-і S3-ізоформ) і оптимальний (S4-ізоформу) - в мітохондріях.

Встановлена залежність активності ензимів, які перетворюють H_2O_2 , від фізіологічного стану яєчника підтверджує, що культура клітин вилучена зі статевої залози «раннього жовтого тіла» характеризується й низькими величинами значень ГПО і КАТ. Причинами зниження активності ГПО можуть бути: інгібування активного центру ензиму [356] або окиснення [357] чи понижене відновлення Г-SH, що залежить від НАДФН і активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази [358]. Клітини з яєчників «свіжої овуляції» і «пізнього жовтого тіла» характеризуються вищими активностями як ГПО, так і КАТ, що

характеризує дисбаланс окисних процесів в клітинах й понижену здатність до виживання. При цьому, зростання активності КАТ є одним із характерних маркерів високого рівня окиснювальних процесів і нагромадження Гідрогену пероксиду в клітинах гранульози [42]. У гранульозі з фолікулів яєчника «фолікулярного росту» зростання активності ГПО, при пониженой КАТ, свідчить про фізіологічний рівень окисних процесів та здатність клітин до існування за культивування *in vitro*.

Слід зауважити, що здатність клітин утилізувати H_2O_2 залежить не тільки від фізіологічного стану яєчників, але й від розміру фолікулів з яких вони вилучені. Це, ймовірно, зумовлено потенційною можливістю використовувати субстрати середовищ та ресинтезувати АТФ, пристосовуватись до умов культивування і продукувати фактори, що гальмують утворення активних форм Оксигену [359, 360, 361, 362, 363]. Зокрема, такі можливості характерні для клітин з великого фолікула яєчників «фолікулярного росту» та «пізнього жовтого тіла» - стабільно висока активність досліджених ензимів антиоксидантного захисту свідчить про ефективність перетворення цитотоксичних сполук Оксигену. Одночасно, підвищена активність СОД та КАТ і понижена ГПО в гранульозі з всіх фолікулів яєчника «свіжої овуляції», низька активність СОД та ГПО з великого і середнього - «раннього жовтого тіла» вказують на дисбаланс окисних процесів в клітинах й понижену здатність до виживання.

Про вплив процесів мітохондріального окиснення на активність ензимів антиоксидантного захисту гранульози свідчить додавання пірувату до складу середовищ культивування: в RPMI-1640 підвищується активність СОД (10,2 - 33,4 %) і знижуються ГПО (6,7 - 10,4 %) та КАТ (18,7 - 21,4 %), а в ВМЕ - зростають активності ГПО (29,7 - 38,8 %) і КАТ (15,4 - 30,2 %) та знижується СОД (16,3 - 23,8 %).

Ще одним з факторів, який впливає на активність ензимів антиоксидантного захисту є пасажування клітин. Зокрема, за вказаних умов в клітин гранульози, порівняно з первинною культурою, знижується активність

СОД та підвищується КАТ і ГПО. Подібні результати отримані при дослідженні загальної активності СОД та експресії Mn-SOD і Cu,Zn-SOD клітини гранульози і ОКК залежно від тривалості культивування: величини їх значень знижуються зі збільшенням часу культивування. Аналогічні зміни характерні за зниження репродуктивної функції при старінні – зменшення утворення СОД і КАТ в клітинах гранульози передовуляторних фолікулів [98, 309].

Про вплив дисбалансу між рівнем нагромадження H_2O_2 та його перетворення і утворенням гормонів свідчить негативна ($\eta = 0,404$) кореляція активності КАТ з концентрацією прогестерону. Однак, помірне утворення H_2O_2 і активування ГПО забезпечує пропорційне збільшення концентрації вказаного гормону в культурі клітин ($\eta = 0,554$). Одночасно не виявлено залежності між активністю ензимів, які перетворюють Гідрогену пероксид з концентраціями естрадіолу і тестостерону ($\eta = 0,09 - 0,272$).

Ензими клітин гранульози, що конвертують H_2O_2 , як встановлено електрофорезом в ПААГ, після специфічного зафарбування проявляються безбарвними смугами, різними за рухливістю в електричному полі та площею: ГПО - 5 – 6, а КАТ – 2 смугами протеїнів. Ізозими ГПО та КАТ, їх вміст у культурі клітин, як і активність ензимів, залежать від фізіологічного стану яєчників й розміру фолікулів з яких вилучена гранульоза. При цьому, виявляються особливості вмісту окремих ізозимів і, очевидно, утворення H_2O_2 в культурі клітин гранульози. Так, найвищий вміст ГПО1 (24,7 — 26,2 %) характерний для клітин з фолікулів: малого і великого яєчників фізіологічного стану «фолікулярного росту» та середніх — «раннього та пізнього жовтого тіла», ГПО2 — з малого - «раннього жовтого тіла» ($42,6 \pm 11,31$ %), ГПО3 — з середнього «свіжої овуляції» ($42,5 \pm 24,40$ %), ГПО4 ($28,8 \pm 13,40$ %) і ГПО5 ($38,0 \pm 11,90$ %) з фолікулів, відповідно, менше 4 мм і 4 – 7 мм «пізнього жовтого тіла». Як впливає з порівняльного аналізу спектру ізозимів ГПО клітин гранульози (рис. 3.5), ГПО3 відповідає цитозольному ізозиму, виявленому в еритроцитах. Функція вказаного ізозиму полягає у захисті клітин

від окиснювального стресу [364] і пригніченні апоптозу, який індукований H_2O_2 [365]. Очевидно, в гранульозі з середнього фолікула яєчника «свіжої овуляції» утворення Гідрогену пероксиду в цитозолі значно вище, ніж у клітин з інших фолікулів, що й призводить до зростання ГПОЗ. Припущення підтверджується результатами вивчення вмісту ізозимів КАТ — максимальна величина КАТ2 (86,6 – 88,7 %), як і, відповідно, мінімальна КАТ1, характерні для гранульози з середнього фолікула яєчника «свіжої овуляції» та малого «раннього жовтого тіла». КАТ1 є мономером ензиму, який знаходиться в пероксисомах, а КАТ2 - тетрамерний ізозим - в цитозолі [366]. Нагромадження H_2O_2 і, відповідно, зміни вмісту ізозимів КАТ в окремих компартментах клітин гранульози неоднозначно впливають на утворення тестостерону. Так, оскільки КАТ1 є мономером ензиму, який знаходиться в пероксисомах, збільшення його вмісту вказує на підвищений рівень окисних процесів, надлишкове утворення H_2O_2 , що своєю чергою, пригнічує процеси синтезу тестостерону ($\eta = 0,446$). І навпаки, вищий вміст КАТ2 в цитозолі, ймовірно, забезпечує захист від окиснення ліпопротеїнів, чи навпаки, свідчить про їх підвищене перетворення і, як наслідок, надходження компонентів (холестеролу) для утворення гормону. Вказані можливі варіанти впливу КАТ2 на утворення тестостерону обґрунтовані позитивною середньою за силою кореляції ($\eta = 0,545$).

Також, утворення тестостерону клітинами гранульози залежить від вмісту ізозимів ГПО. Зокрема, низькі та високі величини вмісту ГПО1, ГПО2 (відповідно, менше 15,0 % і більше 30,0 %; $\eta = 0,421 - 0,513$), ГПО4 (менше 5,0 і більше 15,0 %; $\eta = 0,390$) і ГПО5 (менше 15,0 і більше 20,0%; $\eta = 0,388$) забезпечують максимальну концентрацію тестостерону, а за середніх значень (15,0 - 30,0, 5,0 - 15,0 і 15,0 - 20,0 %) - проявляється понижений вміст гормону (2,7 - 2,9 нмоль/л). Оскільки ГПО1, ГПО2 і ГПО4 руйнують пероксили ліпідів і фосфоліпідів та захищають протеїни від окиснення [367], ймовірно, виявлені оптимальні межі вмісту ізозимів забезпечують ефективне знищення цитотоксичних сполук Оксигену та захист структурних елементів клітин і субстратів від руйнування, що зумовлює підвищення утворення гормону.

Подібно, ГПО5 регулює вміст відновленої форми Г-SH в екстрацелюлярному просторі і, можливо, запобігає змінам в структурі мембран та підтримує транспорт метаболітів у клітину. Поряд з цим, зростаючий вміст ГПО3, який захищає клітинні мембрани від окиснення та знищує пероксиди негативно корелює ($\eta = 0,393$) з концентрацією тестостерону, що може бути пов'язано з посиленням захистом від руйнування ліпопротеїнових комплексів і, відповідно, зменшене вивільнення з їх складу холестеролу — субстрату для синтезу тестостерону. Проте, захист мембран клітин від окиснення і знищення гідропероксидів фосфоліпідів ГПО3 в цитозолі та ГПО4 в мітохондріях зумовлює підвищене утворення естрадіолу ($\eta = 0,418$), що, ймовірно, визначено контрольованими процесами знищення надлишку активних сполук Оксигену і перетворення тестостерону в естрадіол.

Підвищена дихальна активність і високий рівень антиоксидантного захисту в культурі клітин з яєчників фізіологічного стану «фолікулярного росту» забезпечують впродовж культивування підтримання вмісту загального протеїну на вихідному рівні, а з «пізнього жовтого тіла» і «свіжої овуляції», ймовірно, його використання чи окиснення, що супроводжується зниженням величини показника. Одночасно, підвищення величини значення показника в культурі вказує на здатність гранульози з середніх фолікулів яєчника «раннього жовтого тіла» утворювати протеїни. Отриманий результат узгоджується з дослідженнями про синтез клітини гранульози протеогліканів, глікозаміногліканів, окремих ензимів, факторів росту та інші протеїнів [34, 368]. Поряд з вказаним, підвищення вмісту загального білка неоднозначно характеризує ефективність утворення гормонів клітинами: знижується концентрація тестостерону ($\eta = 0,500$), і навпаки, підвищується утворення прогестерону ($\eta = 0,524$). Одним із факторів, що може визначати вказану особливість клітин гранульози може бути зміна метаболічної активності їх - розщеплення ліпопротеїдів і використанням холестеролу для перетворення тестостерону у прогестерон.

Встановлені різниці вмісту загального білка характеризуються якісними й кількісними відмінностями спектру розчинних протеїнів культури клітин. Зокрема, понижений вміст γ -3 і γ -2-глобулінів в культурі клітин з яєчника «фолікулярного росту» може свідчити про розчеплення ліпопротеїнів дуже низької щільності (ЛПДНЩ) чи низької щільності (ЛПНЩ) і використання ліпідних компонентів у метаболічних процесах клітинами, зокрема, холестеролу для стероїдогенезу [369, 370, 371]. Ймовірність таких перетворень підтверджується вмістом γ 3-глобулінів — фракції розчинних протеїнів, в межах якої локалізуються й ЛПДНЩ та ЛПНЩ і зростання вмісту яких супроводжується підвищенням концентрацій тестостерону і прогестерону (відповідно, $\eta = 0,438$ і $0,373$). На можливість таких перетворень вказує вірогідно вищий ($p < 0,001$) вміст γ -1-глобулінів в культурі клітин з яєчника «фолікулярного росту», порівняно з гранульозою зі статевої залози «свіжої овуляції». Одночасно, вірогідно вищий вміст металотранспортуючих протеїнів (зона β -глобулінів) у культурі гранульози з фолікулів яєчника «фолікулярного росту» підтверджує вищу здатність клітин до окиснення і використання субстратів у метаболічних процесах. Серед протеїнів вказаної зони виявляються й ізозими КАТ [372]. Крім того, розчеплення ліпідної частини протеїнів і використання холестеролу для синтезу стероїдних гормонів, призводить до підвищення електрофоретичної рухливості їх, що своєю чергою, зумовлює зростання вмісту β -глобулінів. Використаний холестерол для синтезу гормонів і утворений естрадіол, відповідно, негативно корелює з вмістом β -глобулінів ($\eta = 0,338$) культури клітин.

Поряд з вказаними змінами, вищий ($p < 0,05$) вміст протеїнів зони α 1-, α 2- і α -3-глобулінів у культурі клітин зі статевої залози «свіжої овуляції» може вказувати на розщеплення і використання ліпідної частини ліпопротеїнів клітинами, що призводить до підвищення електрофоретичної рухливості і зміщення спектру в бік вказаних фракцій. Також відомо, що в зоні рухливості α -глобулінів виявляються протеїнази та інгібітори метаболічної активності [85]. Крім того, для культури клітин з яєчника «свіжої овуляції», порівняно з

іншими, характерний понижений вміст альбуміну ($p < 0,05 - 0,01$), що може свідчити про низьку здатність гранульози здійснювати міжклітинний обмін і нагромаджувати метаболіти, оскільки альбумін є основним транспортним протеїном [373].

Нами доведено, що зі зростанням вмісту альбуміну підвищується здатність клітин гранульози утворювати тестостерон ($\eta = 0,505$). Встановлена позитивна залежність свідчить про участь білка у транспорті компонентів для синтезу *de novo* гормону. Вказана здатність альбуміну також підтверджується результатами, отриманими при проведенні електрофорезу ДСН-ПААГ - втрата білком з ММ 66,2 кДа ліпідної частини чи інших компонентів за інкубування зразків при 100°C негативно корелює з концентраціями тестостерону і естрадіолу (відповідно, $\eta = 0,378$ і $0,347$).

Оцінювання вмісту пре-альбумінів свідчить, що найнижчими величинами їх значень характеризується культура гранульози з яєчника фізіологічного стану «фолікулярного росту». Ймовірно, вміст протеїнів вказаної зони свідчить про стабільність структур клітин, оскільки поява протеїнів з високою електрофоретичною рухливістю може характеризувати руйнування мембран і вихід компонентів цитозолу у середовище культивування. Однак, зростання вмісту пре-альбумінів характеризує підвищене утворенням естрадіолу ($\eta = 0,325$), що, можливо, є наслідком розчеплення і використання ліпідної частини ліпопротеїнів, зменшенням розмірів молекул протеїнів і, відповідно, збільшення електрофоретичної їх рухливості.

Подібні зміни розчинних протеїнів встановлені при аналізі їх спектру в культурі з урахуванням розміру фолікулів з яких вилучені клітини. Однак, неоднозначність і особливості їх вмісту в культурі гранульози залежно від розміру фолікула вказують на індивідуальний рівень метаболізму, здатність використовувати та утворювати протеїни.

Оцінювання спектру окремих протеїнів з використанням ДСН-ПААГ виявило подібну залежність їх вмісту в культурі клітин від розміру фолікулів та фізіологічного стану з яєчників яких вилучена гранульоза. Для клітин зі

статевої залози «фолікулярного росту», порівняно з культурою гранульози з інших фізіологічних станів статевих залоз (особливо «свіжої овуляції»), характерний вірогідно вищий вміст протеїнів більше 66,2 ($p < 0,05 - 0,01$), 31,0 ($p < 0,001$) і менше 14,4 ($p < 0,001$) кДа. Отриманий результат дозволяє припускати, що структурні компоненти (мембрани — цитоплазматична та органел) клітин збережені, а інтенсивніше використання субстратів гранульозою зі статевий залози «фолікулярного росту» забезпечує утворення і синтез ензимів антиоксидантного захисту та факторів, що підтримують і стимулюють метаболізм клітин. Припущення узгоджується з результатами досліджень про межі локалізації ензимів АОЗ (СОД, ГПО і КАТ), StAR (ММ 28 кДа), інгібін (ММ 31 і 58 кДа), інсуліноподібного фактору зростання (IGFBP7; ММ 31 кДа) [83, 374, 375]. StAR регулює переміщення холестеролу від зовнішньої до внутрішньої мітохондріальної мембрани, що є лімітуючою стадією стероїдогенезу, інгібін стимулює в клітинах теки утворення андрогенів, а IGFBP7 — регулює ріст клітин гранульози. Вище наведені результати досліджень підтверджуються аналізом кореляцій вмісту білків з ММ 45,0–66,2 кДа та концентраціями тестостерону ($\eta = 0,404$) і естрадіолу ($\eta = 0,335$) — позитивними за напрямком. Також, встановлені позитивні кореляції між протеїнів з ММ 14,4 - 66,2 кДа та концентрацією тестостерону ($\eta = 0,307 - 0,480$) і з вмістом з ММ 14,4 - 31, 45 - 66,2 і більше 94 кДа та естрадіолом ($\eta = 0,327 - 0,439$). Поряд з цим, за 1,0 - 2,0 % протеїнів менше 14,4 кДа виявлена максимальна концентрація естрадіолу ($\eta = 0,302$) та за 2,1 - 3,0 % ММ 14,4 кДа і менше — прогестерону ($\eta = 0,342 - 0,390$). До протеїнів зони вказаних молекулярних мас входить один з факторів росту клітин - інсулін (ММ 12 кДа).

Оцінюванням здатності утворювати статеві гормони гранульозою виявлено, що найвищі концентрації тестостерону і естрадіолу продукують клітини вилучені з фолікулів яєчника «фолікулярного росту». При цьому, здатність до стероїдогенезу найбільше проявляється в клітин з домінуючого фолікула (більше 7 мм), оскільки гранульоза утворює найбільше тестостерону ($4,6 \pm 0,63$ нмоль/л). Встановлена висока концентрація тестостерону в культурі

клітин з великого фолікула яєчника «фолікулярного росту» узгоджується з більш високим вмістом протеїнів зони 31,0 кДа – інгібіну стимулюючого чинника утворення андрогенів.

Поряд з вказаним, високі значення естрадіолу в гранульозі з фолікулів яєчника «свіжої овуляції», ймовірно, зумовлені постгонадотропним ефектом, можливістю клітин засвоювати субстрати і продукувати вказаний гормон. Встановлена здатність гранульози узгоджується з дослідженнями *in vivo* як про вплив FSH на ріст фолікулів 1 – 3 мм [376], так і про їх можливість рости та дозрівати, після втрати домінуючого [377]. Одночасно, культивовані клітини, які вилучені з фолікулів яєчника «пізнього жовтого тіла», проявляють найвищу здатність утворювати прогестерон, що характеризує вплив жовтого тіла [378].

На основі середовища культивування клітин гранульози (тривалість культивування 7-14 діб) виготовлено препарат зі стимулювання відтворної функції корів. Після двохразового введення препарату «Фоліген» 30 корів із 40 піддослідних (75%) прийшли в охоту і були запліднені, що вище на 35,0 %, порівняно з використаною (традиційною) схемою стимулювання репродуктивної функції корів.

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 $O/xv \times 0,1$ мл суспензії клітин (СК), відновною здатністю — $4,3 \pm 0,19 K_3[Fe(CN)_6]/xv \times 0,1$ мл СК, активністю ензимів (мкмоль / $xv \times$ 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 становить 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 «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 γ 1-, β -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-ізозиму 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 статеву функцію 35,0 %, а після повторного (через 10 – 12 діб) — ще 40,0 % корів.

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

1. З метою відновлення репродуктивної функції корів уводити внутрішньом'язово, дворазово, з інтервалом 10–12 діб, по 10 мл на тварину (0,02 мл/кг м. т.) 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.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Яблонський В. А. Ветеринарне акушерство та біотехнологія відтворення тварин з основами андрології / В. А. Яблонський, С. П. Хомин, Г. М. Калиновський — Вінниця: Нова книга, 2006.— 92 с.
2. Pangas S. A. The Art and Artifact of GDF9 Activity: Cumulus Expansion and the Cumulus Expansion-Enabling Factor / S. A. Pangas, M. M. Matzuk // *Biol. Reprod.* — 2005. — V. 73, № 4. — P. 582–585.
3. Guigon C. J. Contribution of Germ Cells to the Differentiation and Maturation of the Ovary: Insights from Models of Germ Cell Depletion / C. J. Guigon, S. Magre // *Biol. of Reprod.* — 2006. — V. 74, № 3. — P. 450–458.
4. Gilchrist R. B. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality / R. B. Gilchrist, M. Lane, G. Jeremy // *Hum. Reprod.* — 2008. — V. 14. — P. 159–177.
5. FitzHarris G. Regulation of intracellular pH during oocyte growth and maturation in mammals / G. FitzHarris, J. Baltz // *Reprod.* — 2009. — V. 138. — P. 619–627.
6. Yang M. Y. Testosterone Stimulates the Primary to Secondary Follicle Transition in Bovine Follicles In Vitro / M. Y. Yang, J. E. Fortune // *Biol. Reprod.* — 2006. — V. 75. — P. 924–932.
7. Tosca L. Effects of Metformin on Bovine Granulosa Cells Steroidogenesis: Possible Involvement of Adenosine 5' Monophosphate-Activated Protein Kinase (AMPK) / L. Tosca, C. Chabrolle, S. Uzbekova, J. Dupont // *Biol. of Reprod.* — 2007. — V. 76, № 3. — P. 368–378.
8. 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 // *Reprod.* — 2006. — V. 131. — P. 999–1006.
9. Harris S. E. Carbohydrate metabolism by murine ovarian follicles and oocytes grown in vitro / S. E. Harris, A. Iris, H. J. Leese. // *Reprod.* — 2007. — №134. C. 415–424.

10. Zheng X. Role of transforming growth factor- β 1 in gene expression and activity of estradiol and progesterone-generating enzymes in FSH-stimulated bovine granulosa cells / X. Zheng, C. A. Price, Y. Tremblay // *Reprod.* — 2008. — V. 136. — P. 447–457.
11. Седіло Г. М. Вплив екстракту алое на вміст неетерифікованих жирних кислот в еритроцитах крові та репродуктивну функцію корів різної молочної продуктивності / Г. М. Седіло, О. Б. Дяченко // *Передгірське та гірське землеробство і тваринництво.* — Львів-Оброшино, 2013. — Вип. 55., ч. I. — С. 186–197.
12. Celik E. A comparative study on oxidative and antioxidative markers of serum and follicular fluid in GnRH agonist and antagonist cycles / E. Celik, O. Celik, B. Kumbak, E. Yilmaz et al. // *J. Assist Reprod. Genet.* — 2012. — V. 29. — P. 1175–1183.
13. Hennet M. L. Follicular fluid hydrogen peroxide and lipid hydroperoxide in bovine antral follicles of various size, atresia, and dominance status / M. L. Hennet, H. Y. Yu, C. M. H. Combelles // *J. Assist Reprod Genet.* — 2013. — V.30 — P. 333–340.
14. Поліщук С. А. Інтенсивність перекисного окиснення ліпідів та окисної модифікації протеїнів у спермі кнурів-і бугаїв-плідників / С. А. Поліщук, С. І. Цехмістренко, В. А. Коберська // *Український біохімічний журнал* — 2014. — Вип. 86, № 5 — С. 258.
15. Itoha T. Growth, Antrum Formation, and Estradiol Production of Bovine Preantral Follicles Cultured in a Serum-Free / T. Itoha, M. Kacchia, H. Abea, Y. Sendaia // *Med. Biol. Reprod.* — 2002. — V. 67. — P. 1099–1105.
16. Bausenwein J. Elevated levels of oxidized low-density lipoprotein and of catalase activity in follicular fluid of obese women / J. Bausenwein, H. Serke, K. Eberle, J. Hirrlinger, et al // *Mol. Hum. Reprod.* — 2010. — V. 16, №2. — P. 117–124.
17. Смолянинов Б. В. Контроль и воспроизводительная функция самок сельскохозяйственных животных. / Б. В. Смолянинов, М. А. Кротких Одесса: СМІЛ. — 2004. — 196 с.

18. Кононов В. П. Биотехника репродукции в молочном скотоводстве / В. П. Кононов, Ченных В. Я. — М., 2009. — 365 с.
19. Chen L. Hyaluronic acid synthesis and gap junction endocytosis are necessary for normal expansion of the cumulus mass / L. Chen, S. E. Wert, E. M. Hendrix // *Mol. Reprod. Dev.* — 1990. V. 26. — P. 236–247.
20. Salustri A. Synthesis and accumulation of hyaluronic acid and proteoglycans in the mouse cumulus cell-oocyte complex during follicle-stimulating hormone-induced mucification / A. Salustri, M. Yanagishita, V. C. Hascall // *J. Biol. Chem.* — 1989. — V. 264. — P. 13840–13847.
21. Toloue M. Measuring the selectivity and rate of natural metabolite transfer through gap junctions of different composition / M. Toloue, B. Nicholson // *The FASEB Journal.* — 2007. — V. 21. — P. 489 – 516.
22. Su Y.Q. Mouse oocyte control of granulosa cell development and function: paracrine regulation of cumulus cell metabolism. / Y. Q. Su, K. Sugiura, J. J. Eppig // *Seminars in Reproductive Medicine.* — 2009. — V. 27. — P. 32–42.
23. Eppig J. J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals / J. J. Eppig // *Reprod.* — 2001. — Vol. 122. — P. 829–838.
24. Dong J. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis / J. Dong, D. F. Albertini, K. Nishimori, T. R. Kumar et al // *Nature.* — 1996. — V. 383. — P. 531–535.
25. Li R. Oocyte-secreted factors determine functional differences between bovine mural granulosa cells and cumulus cells / R. Li, R. J. Norman, D. T. Armstrong, R. B. Gilchrist // *Biol. Reprod.* — 2000. — V. 63. — P. 839–845.
26. Joyce I. M. Comparison of recombinant growth differentiation factor-9 and oocyte regulation of KIT ligand messenger ribonucleic acid expression in mouse ovarian follicles / I. M. Joyce, A. T. Clark, F. L. Pendola // *Biol. Reprod.* — 2000. — V. 63. — P. 1669–1675.
27. McNatty K.P. Oocyte-expressed genes affecting ovulation rate / K. P. McNatty, P. Smith, L. G. Moore, K. Reader, et. al. // *Mol. Cell Endocrinol.* — 2005. — V. 234. — P. 57–66.

28. Singh J. Histomorphometry of dominant and subordinate bovine ovarian follicles / J. Singh // *Anat. Rec.* — 2000. — V. 258— P. 58–70.
29. Calado A. M. A stereological study of medium antral follicles during the bovine estrous cycle / A. M. Calado , E. Rocha, A. Colaço, M. Sousa. // *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* — 2005. — V. 57.— P. 465–475.
30. Irving-Rodgers H. F. Atresia revisited: two basic patterns of atresia of bovine antral follicles / H. F. Irving-Rodgers, I. L. van Wezel, M. L. Mussard, J. E. Kinder, et al. // *Reprod.* — 2001. — V. 122. — P. 761–775.
31. Irving-Rodgers H. F. A novel basal lamina matrix of the stratified epithelium of the ovarian follicle / H. F. Irving-Rodgers, M. L. Harland, R. J. Rodgers // *Matrix. Biol.* — 2004. — V. 23. — P. 207–217.
32. Spanel-Borowski K. Varying morphology of bovine granulosa cell cultures / K. Spanel-Borowski, A. M. Ricken // In: P. M. Motta, Editor, *Microscopy of Reproduction and Development: A Dynamic Approach*, Antonio Delfino Editore, Rome — 1997. — P. 91 – 100.
33. Irving-Rodgers H. F. Composition and morphology of the follicular basal lamina during atresia of bovine antral follicles / H. F. Irving-Rodgers, M. L. Mussard, J. E. Kinder, R. J. Rodgers // *Reprod.* — 2002. — V. 123. — P. 97–106.
34. Calado A. M. Ultrastructural and cytochemical characterization of follicular cell types in bovine (*Bos taurus*) cumulus–oocyte complexes aspirated from small and medium antral follicles during the estrus cycle / A. M. Calado, E. Oliveira, A. Colaço, M. Sousa // *Animal. Reprod. Science.* — 2011. — V. 123. — P. 23–31.
35. Larsen W. J. Cumulus expansion initiates physical and developmental autonomy of the oocyte / W. J. Larsen, L. Chen, R. Powers, H. Zhang, P. T. Russell, C. Chambers, K. Hess, R. Flick // *Zygote.* — 1996. — V. 4. — P. 335–341.
36. Emmen J. M. In vitro growth and ovulation of follicles from ovaries of estrogen receptor (ER) (alpha) and ER (beta) null mice indicate a role for ER β in follicular maturation / J. M. Emmen, J. F. Couse, S. A. Elmore // *Endocrin.* — 2005. — V. 146. — P. 2817–2826.

37. Mihm M. Differentiation of the bovine dominant follicle from the cohort upregulates mRNA expression for new tissue development genes *Reproduction* / M. Mihm, P. Baker, L. Fleming, A. Monteiro // — 2008. — V. 135. — P. 253–265.
38. 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. — V. 51. — P. 541–550.
39. Makanji Y. Hypoxia-mediated carbohydrate metabolism and transport promote early-stage murine follicle growth and survival / Y. Makenji, D. Tagler, J. Pahnke, L. D. Shea et al. // *Am. J. Physiology: Endocrinology and Metabolism*. — 2014 — V. 306, №8 — P. 893–903
40. Sugiura K. Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: energy metabolism / K. Sugiura, L. F. Pendola, J. J. Eppig // *Devel. Biol.* — 2005. — V. 279. — P. 20–30.
41. Gook D. A. Impact of oxygen concentration on adult murine pre-antral follicle development in vitro and the corresponding metabolic profile / D. Gook, D. Edgar, K. Lewis, J. Sheedy, et al. // *Molec. Hum. Reprod.* — 2014. — V. 20. — P. 31–41.
42. Roberts A. J. In Vitro Production of Estradiol by Bovine Granulosa Cells: Evaluation of Culture Condition, Stage of Follicular Development, and Location of Cells Within Follicles / A. J. Roberts, S. E. Echtenkamp // *Biol. Reprod.* — 1994. — V. 51. — P. 273–282.
43. Ying S. 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, H. Nie // *Reprod.* — 2011. — V. 142. — P. 699–710.
44. Zeng H.-T. Prematuration with Cyclic Adenosine Monophosphate Modulators Alters Cumulus Cell and Oocyte Metabolism and Enhances Developmental Competence of In Vitro-Matured Mouse Oocytes / H.-T. Zeng, D. Richani, M. L. Sutton-McDowall, Zi Ren, et al. // *Biol. Reprod.* — 2014. — V. 91 (2) — P. 47–56.

45. 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 // *Reprod.* — 2004. — V. 128, № 3. — P. 313–319.
46. Takehiro I. Antrum Formation, and Estradiol Production of Bovine Preantral Follicles Cultured in a Serum-Free Medium / I. Takehiro, K. Masayuki // *Biol. Reprod.* — 2002. — V. 67. — P. 1099–1105.
47. FitzHarris G. Granulosa cells regulate oocyte intracellular pH against acidosis in preantral follicles by multiple mechanisms / G. FitzHarris, V. Siyanov, J. M. Baltz // *Development* — 2007. — V. 134. — P. 4283–4295.
48. Остапів Д. Д. Окисно-відновні процеси в статевих клітинах бугаїв і корів, способи оцінювання якості та підвищення запліднюваності. – Автореф. дис. на здобуття наукового ступеня док. с.-г. наук за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин. — Львів. — 2008. — 40 с.
49. Leese H. Pyruvate and glucose uptake by mouse ova and preimplantation embryos / H. Leese, A. Barton // *J. Reprod. Fertil.* — 1984. — V. — 72. — P. 9–13.
50. Leese H. J. Production of pyruvate by isolated mouse cumulus cells / H. J. Leese, A. M. Barton // *J. Exp. Zool.* — 1985. — V. 234. — P. 231–236.
51. Preis K.A. Metabolic markers of developmental competence for in vitro-matured mouse oocytes. /K.A. Preis, G. Seidel, D. K. Gardner // *Reproduction* — 2005. — V. 130. — P. 475–483
52. Rieger D. Changes in the metabolism of glucose, pyruvate, glutamine and glycine during maturation of cattle oocytes in vitro / D. Rieger, N. M. Loskutoff // *J. Reprod. Fertil.* — 1994. — V. 100. — P. 257–262.
53. 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, D. L. Becker et al. // *Biol. Reprod.* — 2004.— V. 71. — P.199–209.
54. Geshi M. Effects of Sodium Pyruvate in Nonserum Maturation Medium on Maturation, Fertilization, and Subsequent Development of Bovine Oocytes With or

Without Cumulus Cells / M. Geshi, N. Takenouchi, N. Yamauchi // *Biol. Reprod.* — 2000. — V. 63. — P. 1730–1734.

55. Markert C. L. Lactate dehydrogenase isozymes: dissociation and recombination of subunits / C. L. Marker // *Science* — 1963. — V. 140. — P. 1329–1330.

56. Markert C. L. Evolution of a gene: multiple genes for LD isozymes provide a model of the evolution of gene structure, function and regulation / C. L. Markert, J. B. Shakelee, G. S Whitt // *Science* — 1975. — V. 189. — P. 102–114.

57. Maekawa M. Lactate dehydrogenase isoenzymes / M. Maekawa // *J. Chrom. Biomed.* — 1988. — V. 429. — P. 373–398.

58. Sharma P. R. Utility of serum LDH isoforms in the assessment of *Mycobacterium tuberculosis* induced pathology in TB patients of sahariya tribe / P. R. Sharma, S. Jai, R. N. K. Bamezai, P. K Tiwari // *In. J. Clin. Biochem.* — 2010. — V.25. — P. 57–63.

59. Goodfriend T. L. Control of synthesis of lactic acid dehydrogenases / T. L. Goodfriend, D. M. Sokol, N. O. Kaplan // *J. Mo. Biol.* — 1966. — V.15. — P.18–31.

60. Clark W. Lactic Dehydrogenase in the Rat Uterus During Progestation, Its Relation to Intrauterine Oxygen Tension and the Regulation of Glycolysis / W. Clark, J. M. Yochim // *Biol. Reprod.* — 1971. — V.5. — P. 152–160.

61. 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.

62. Gook D. A. Impact of oxygen concentration on adult murine pre-antral follicle development in vitro and the corresponding metabolic profile / D. A. Gook, D.H. Edgar, K. Lewis, J.R. Sheedy et al. // *Mol. Hum. Reprod.* — 2014. — V.20 (1) — P. 31–41.

63. Gull I. Anaerobic glycolysis. The metabolism of the preovulatory human oocyte / I. Gull, E. Geva, L. Lerner-Geva // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* — 1999. — V. 85. — P. 225–228.

64. Fischer B. Oxygen tension in follicular fluid falls with follicle maturation / B. Fischer, W. Kunzel, J. Kleinstein // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* — 1992. — V. 43. — P. 39–43.
65. Minárik P. Malate Dehydrogenases Structure and Function / P. Minárik, N. Tomáková, M. Kollárová, M. Antalík // *Gen. Physiol. Biophys.* — 2002. — V. 21. — P. 257–265.
66. Goward C. R., Nicholls D. J. Malate dehydrogenase a model for structure, evolution and catalysis / C. R. Goward, D. J. Nicholls // *Protein. Sci.* — 1994. — V. 3. — P. 1883–1888.
67. Hill E. Polypeptide conformation of cytoplasmic malate dehydrogenase from an electron density map at 30 Angstrom resolution / E. Hill, D. Tsernoglou, L. Webb, L. Banaszak // *J. Mol. Biol.* — 1972. — V. 72. — P. 577–591.
68. Birktoft J. J. Comparison of the molecular structure of cytoplasmic and mitochondrial malate dehydrogenase / J. J. Birktoft, G. E. Carnahan, G. Rhodes, S. L. Roderick, L. J. Banaszak // *Biochem. Soc. Trans.* — 1989. — V. 17. — P. 301–304.
69. Chien S. M. Import of rat liver mitochondrial malate dehydrogenase Binding of the precursor to mitochondria, an intermediate step in import / S. M. Chien, K. B. Freeman // *J. Biol. Chem.* — 1984. — V. 259. — P. 3337–3343.
70. Birktoft J. J. Structure of porcine heart cytoplasmic malate dehydrogenase combining X-ray diffraction and chemical sequence data in structural studies / J. Birktoft, R. Bradshaw, L. Banaszak // *Biochem.* — 1987. — V. 26. — P. 2722–2734.
71. Faff-Michalak L. Aspartate aminotransferase, malate dehydrogenase, and pyruvate carboxylase activities in rat cerebral synaptic and nonsynaptic mitochondria: effects of in vitro treatment with ammonia, hyperammonemia and hepatic encephalopathy / L. Faff-Michalak, J. Albrecht // *Metab. Brain. Dis.* — 1991. — V. 6. — P. 187–197.
72. Нельсон Д. Л. Основи біохімії за Ленінджером / Д. Л. Нельсон, М. М. Кокус / під ред. С. Комісаренко. — Львів: БаК, 2015. — 1280 с.

73. Agarwal A. Role of oxidative stress in female reproduction / A. Agarwal, S. Gupta, R. K. Sharma // *Reprod. Biol. Endocrin.* — 2005. — V. 3. — P. 1–21.
74. Harman D. Free radical theory of aging: an update: increasing the functional life span / D. Harman // *N. Y. Acad. Sci.* — 2006. — V. 1067. — P. 10–21.
75. Hanukoglu I. Antioxidant protective mechanisms against reactive oxygen species (ROS) generated by mitochondrial P450 systems in steroidogenic cells / I. Hanukoglu // *Drug. Metab. Rev.* — 2006. — V. 38. — P. 171–196.
76. Roberts R. A. Nitrate and oxidative stress in toxicology and disease / R. A. Roberts, D. L. Laskin, C. V. Smith, F. M. Robertson // *Toxicol. Sci.* — 2009. — Vol. 112. — P. 4–16.
77. Jones D. P. Radical-free biology of oxidative stress / D. P. Jones // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* — 2008. — V. 295. — P. 849–868.
78. Gupta S. Fluctuations in total antioxidant capacity, catalase activity, and hydrogen peroxide levels of follicular fluid during bovine folliculogenesis / S. Gupta, A. Choi, H. Y. Yu, S. M. Czerniak et al. // *Reprod. Fertil. Dev.* — 2011. — V. 23. — P. 673–680.
79. Luck M.R. Minireview: ascorbic acid and fertility. / M. R. Luck , I. Jeyaseelan , R. A. Scholes // *Biol. Reprod.* — 1995. — V. 52. — P. 262–266.
80. Zreik T. G. Identification and characterization of an ascorbic acid transporter in human granulosa-lutein cells / T. G. Zreik, P. H. Kodaman, E. E. Jones, D. L. Olive et al. // *Mol. Hum. Reprod.* — 1999. — V. 5. — P. 299–302.
81. Behrman H. R. Hormone induction of ascorbic acid transport in immature granulosa cells / H. R. Behrman, S. L. Preston, R. F. Aten, P. Rinaudo et al. // *Endocrinology* — 1996. — V. 37. — P. 4316–4321.
82. Musicki B. Endocrine regulation of ascorbic acid transport and secretion in luteal cells / B. Musicki, P. H. Kodaman, R. F. Aten, H. R. Behrman // *Biol. Reprod.* — 1996. — V. 54. — P. 399–406.
83. Tsai-Turton M. Gonadotropin regulation of glutamate cysteine ligase catalytic and modifier subunit expression in the rat ovary is subunit and follicle stage-specific /

- M. Tsai-Turton, U. Luderer // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* — 2005. — V. 289. — P. 391–402.
84. Aten R. F. Regulation of ovarian antioxidant vitamins, reduced glutathione, and lipid peroxidation by luteinizing hormone and prostaglandin F₂α / R. F. Aten, K. M. Duarte, H. R. Behrman // *Biol. Reprod.* — 1992. — V. 46. — P. 401–407.
85. de Matos D. G. Glutathione synthesis during in vitro maturation of bovine oocytes: role of cumulus cells / D. G. de Matos, C. C. Furnus, D. F. Moses // *Biol. Reprod.* — 1997. — V. 57. — P. 1420–1425.
86. Tatemoto H. Protection of Porcine Oocytes Against Apoptotic Cell Death Caused by Oxidative Stress During In Vitro Maturation: Role of Cumulus Cells / H. Tatemoto, N. Sakurai, N. Muto // *Biol. Reprod.* — 2000. — V. 63. — P. 805–810.
87. Junichi F. Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system / F. Junichi, I. Yoshihito, O. Futoshi // *Reprod. Biol. and Endocrin.* — 2005. — V. 3, № 43. — P. 1–10.
88. Houston-Ludlam G. Cu/Zn Superoxide Dismutase: A Key Player in the Antioxidant Defense System / G. Houston-Ludlam // *Genetics.* — 2003. — P. 230.
89. Ho Y-S. Reduced fertility in female mice lacking copper-zinc superoxide dismutase / Y-S. Ho, M. Gargano, J. Cao, R. T. Bronson et al. // *J. Biol. Chem.* — 1998. — P. 273. — P. 7765–7769.
90. Skrzycki M. Extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) - structure, properties and functions / M. Skrzycki, H. Czeczot // *Postepy Hig. Med. Dosw.* — 2004. — V. 24, №. 58. — P. 301–311.
91. Beauchamp C. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels / C. Beauchamp, I. Fridovich // *Anal. Biochem.* — 1971. — V. 44. — P. 276–287.
92. Yu B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species / B. P. Yu // *Physiol. Rev.* — 1995. — V. 75. — P. 139–162.
93. Hideki T. Protection of Porcine Oocytes Against Apoptotic Cell Death Caused by Oxidative Stress During In Vitro Maturation: Role of Cumulus Cells. / T. Hideki, S. Noriaki, M. Norio // *Biol. Reprod.* — 2000. — V. 63. — P. 805–810.

94. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. / W. Dröge // *Physiol Rev.* — 2002. — V. 82. — P. 47–95.
95. Matzuk M. M. Ovarian function in superoxide dismutase 1 and 2 knockout mice / M. M. Matzuk, L. Dionne, Q. Guo, T. R. Kumar, R. M. Lebovitz // *Endocrin.* — 1998. — V. 139. — P. 4008 – 4011.
96. Ho Y-S. Reduced fertility in female mice lacking copper-zinc superoxide dismutase / Y-S. Ho, M. Gargano, J. Cao, R. T. Bronson, I. Heimler, R. J. Hutz // *J. Biol. Chem.* — 1998. — V. 273. — P. 7765–7769.
97. Tatone C. Cellular and molecular aspects of ovarian follicle ageing / C. Tatone F. Amicarelli, M. C. Carbone, P. Monteleone et al. // *Hum. Reprod.* — 2008. — V. 14. — P. 131–142.
98. Van Blerkom J. Mitochondria in human oogenesis and preimplantation embryogenesis: engines of metabolism, ionic regulation and developmental competence. / J. Van Blerkom. // *Reproduction.* — 2004. — V. 128. — P. 269 – 280.
99. Reed D. J. Chemical mechanisms of drug-induced liver injury / D. J. Reed, D. Zakim, T. D. Boyer // *Hepat. A Textbook of Liver Disease.* — Philadelphia: WB Saunders Company, 1990. — P. 737–753.
100. Loscalzo J. Keshan Disease, Selenium Deficiency, and the Selenoproteome / Joseph Loscalzo // *N. Engl. J. Med.* — 2014. — V. 370. — P. 1756-1760.
101. Rhee S.G. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. / S. G Rhee, H. Z. Chae, K. Kim // *Free Radic. Biol. Med.* — 2005. — Vol. 38. — P. 1543 – 1552.
102. Brigelius-Flohe R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases / R. Brigelius-Flohe // *Free. Radic. Biol. Med.* — 1999. — V. 27. — P. 951–965.
103. Kingsley P. D. Developmental expression of extracellular glutathione peroxidase suggests antioxidant roles in decoduum, visceral yolk sac, and skin / P. Kingsley, J. Whitin, H. Cohen, J. Palis // *Mol. Reprod. Dev.* — 1998. — V. 49. — P. 343–355.

104. Ho Y. S. Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia / Y-S Ho, J. L. Magnenat, R. T. Bronson, J. Cao, et al. // *J Biol. Chem.* — 1997. — V. 272. — P.16644–16651.
105. Bai J. Mitochondrial catalase and oxidative injury // *Biol. Signals. Recept.* — 2001. — V. 10, No. 3–4. — P. 189–199.
106. Scibior D. Catalase: structure, properties, functions. / D. Scibior, H. Czeczot // *Postepy. Hig. Med. Dosw.* — 2006. — V. 60. — P. 170–180.
107. Behl R. FSH induced stimulation of catalase activity in goat granulosa cells in vitro / R. Behl, R. Pandey // *An. Reprod. Science.* — 2002. — V. 70. — P. 215–221.
108. Bausenwein J. Elevated levels of oxidized low-density lipoprotein and of catalase activity in follicular fluid of obese women / J. Bausenwein, H. Serke, K. Eberle, J. Hirrlinger, et al. // *Mol. Hum. Reprod.* — 2010. — V. 16, №2 — P. 117–124.
109. Giampietro F. Levels of apoptosis in human granulosa cells seem to be comparable after therapy with a gonadotropin-releasing hormone agonist or antagonist / F. Giampietro, S. Sancilio, G. M. Tiboni, R. A. Rana, et. al // *Fertil Steril.* — 2006. — V. 85. — P. 412–419.
110. Vilser C. The variable expression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor (LOX-1) and signs of autophagy and apoptosis in freshly harvested human granulosa cells depend on gonadotropin dose, age, and body weight / C. Vilser, H. Hueller, M. Nowicki, et al. // *Fertil. Steril.* — 2009. — P. 31.
111. Chaffin C. L. Gonadotropin and steroid regulation of steroid receptor and aryl hydrocarbon receptor messenger ribonucleic acid in macaque granulosa cells during the periovulatory interval / C. L. Chaffin, R. L. Stouffer, D. M. Duffy // *Endocrinology.* — 1999. — V. 140. — P. 4753–4760.
112. Roberts Aj. In Vitro Production of Estradiol by Bovine Granulosa Cells: Evaluation of Culture Condition, Stage of Follicular Development, and Location of Cells Within Follicles' / Aj. Roberts, S. E. Echterkamp // *Biol. Reprod.* — 1994. — V. 51. — P. 273–282.

113. Wright C. S. The development and hormone production of small human ovarian follicles in vitro / C. S. Wright, R. Margara, G. Trew, R. M. L. Winston, et al. // *Hum. Reprod.* — 1999. — V. 14. — P. 16–17.
114. Hillier S. G. Current concepts of the roles of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in folliculogenesis / S. G. Hillier // *Hum. Reprod.* — 1994. — V. 9. — P. 188–191.
115. Stephen F. Follicular dynamics in the polycystic ovary syndrome / F. Stephen, H. Mason, W. Debbie // *Molec. and Cel. Endocrin.* — 2000. — V. 163. — P. 49–52.
116. Simpson E. R. Aromatization of androgens in women: current concepts and findings / E. R. Simpson // *Fertil. Steril.* — 2002. — V. 77. — P. 6–10.
117. Szoltys M. Changes in distribution of androgen receptor during maturation of rat ovarian follicles / M. Szoltys, M. Slomczynska // *Exp. Clin. Endocrin. Diabetes.* — 2000. — V. 108. — P. 228–234.
118. Gill A. Androgens promote maturation and signaling in mouse oocytes independent of transcription: a release of inhibition model for mammalian oocyte meiosis / A. Gill, M. Jamnongjit, S. R. Hammes // *Mol. Endocrinol.* — 2004. — V. 18. — P. 97–104.
119. Juengel J. L. Oestrogen receptor alpha and beta, androgen receptor and progesterone receptor mRNA and protein localisation within the developing ovary and in small growing follicles of sheep / J. L. Juengel, D. A. Heath, L. D. Quirke, K. P. McNatty // *Reprod.* — 2006. — V. 131. — P. 81–92.
120. Hampton J. H. Androgen receptor mRNA expression in the bovine ovary. / J. H. Hampton, M. Manikkam, D. B. Lubahn, M. F. Smith, H. A. // *Garverick Domest Anim. Endocrinol.* — 2004. — V. 27. — P. 81–88.
121. Slomczynska M. Localization of androgen receptor and cytochrome P450 aromatase in the follicle and corpus luteum of the porcine ovary / M. Slomczynska, Z. Tabarowski // *Anim. Reprod. Sci.* — 2001. — P. 65127–65134.
122. Szoltys M. Changes in distribution of androgen receptor during maturation of rat ovarian follicles / M. Szoltys, M. Slomczynska // *Exp. Clin. Endocrin. Diabetes.* — 2000. — V. 108. — P. 228–234.

123. Weil S. J. Androgen receptor gene expression in the primate ovary: cellular localization, regulation, and functional correlations / S. Weil, K. Vendola, J. Zhou, O. Adesanya, et al // *J. Clin. Endocrin. Metab.* — 1998. — V. 83. — P. 2479–2485.
124. Hillier S. G. Evidence that granulosa cell aromatase induction/activation by follicle-stimulating hormone is an androgen receptor-regulated process in-vitro / S. G. Hillier, F. A. De Zwart // *Endocrin.* — 1981. — V. 109. — P. 1303–1305.
125. Hillier S. G. Role of androgens in follicle maturation and atresia / S. G. Hillier, M. Tetsuka // *Baillieres Clin. Obstet. Gynaecol.* — 1997. — V. 11. — P. 249–260.
126. Weil S. Androgen and follicle-stimulating hormone interactions in primate ovarian follicle development / S. Weil, K. Vendola, J. Zhou, C. A. Bondy // *J. Clin. Endocrin. Metab.* — 1999. — V. 84. — P. 2951–2956.
127. Cardenas H. Increased ovulation rate in gilts treated with dihydrotestosterone / H. Cardenas, J. Herrick, W. Pope // *Reprod.* — 2002. — V. 123. — P. 527–533.
128. Wang H. Effect of adrenal and ovarian androgens on type 4 follicles unresponsive to FSH in immature mice / H. Wang, K. Andoh, H. Hagiwara, L. Xiaowei, et al. // *Endocrinol.* — 2001. — V. 142. — P. 4930–4936.
129. Hamel M. Androstenedione increases cytochrome P450 aromatase messenger ribonucleic acid transcripts in nonluteinizing bovine granulosa cells / M. Hamel, J. Vanselow, E. Nicola, et al. // *Mol. Reprod. Dev.* — 2005. — V. 70. — P. 175–183.
130. Harlow C. R. Factors influencing follicle-stimulating hormone-responsive steroidogenesis in marmoset granulosa cells: effects of androgens and the stage of follicular maturity / C. R. Harlow, H. J. Shaw, S. G. Hillier, J. K. Hodges // *Endocrin.* — 1988. — V. 122. — P. 2780–2787.
131. Hillier S. G. Effects of exogenous testosterone on ovarian weight, follicular morphology and intraovarian progesterone concentration in estrogen-primed hypophysectomized immature female rats / S. G. Hillier, G. T. Ross // *Biol. Reprod.* — 1979. — V. 20. — P. 261–268.
132. Azzolin G. C. Effect of androgens on the ovarian morphology of the hypophysectomized rat / G. C. Azzolin, S. Saiduddin // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* — 1983. — V. 172. — P. 70–73.

133. Billig H. Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis / H. Billig, I. Furuta, A. J. Hsueh. // *Endocrin.* — 1993. — V. 133. — P. 2204–2212.
134. Cheng G. A role for the androgen receptor in follicular atresia of estrogen receptor beta knockout mouse ovary / G. Cheng, Z. Weihua, S. Makinen, S. Makela, et al. // *Biol. Reprod.* — 2002. — V. 66. — P. 77–84.
135. Markstrom E. Survival factors regulating ovarian apoptosis—dependence on follicle differentiation / E. Markstrom, E. C. Svensson, R. Shao, B. Svanberg, et al. // *Reprod.* — 2002. — V. 123. — P. 23–30.
136. Hillier S. G. Oestrogen receptor mRNA and a related RNA transcript in mouse ovaries / S. G. Hillier, P. T. Saunders, R. White, M. G. Parker // *J. Mol. Endocrin.* — 1989. — V. 2. — P. 39–45.
137. Cowley S .M. Estrogen receptors α and β form heterodimers on DNA / S. Cowley, S. Hoare, S. Mosselman, M. Parker // *J. Biol. Chem.* — 1997. — V. 272. — P. 19858–19862.
138. Tremblay G. B. Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor β . / G. B. Tremblay, A. Tremblay, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, et al. // *Mol. Endocrin.* — 1997. — V. 11. — P. 353–365.
139. Pelletier G. Localization of oestrogen receptor α , oestrogen receptor β and androgen receptors in the rat reproductive organs / G. Pelletier, C. Labrie, F. J. Labrie // *Endocrin.* — 2000. — V.165. — P.359–370.
140. Jefferson W. N. Expression of estrogen receptor beta is developmentally regulated in reproductive tissues of male and female mice / W. Jefferson, J. Couse, E. Banks, K. Korach, et al. // *Biol. Reprod.* — 2000. — V.62. — P.310–317.
141. Saunders P. T. Differential expression of estrogen receptor- α and - β and androgen receptor in the ovaries of marmosets and humans / P. T. Saunders, M. Millar, K. Williams, S. Macpherson, et al. // *Biol. Reprod.* — 2000. — V. 63. — P. 1098–1105.
142. Mowa C. N. Differential distribution of oestrogen receptor- α and - β mRNAs in

the female reproductive organ of rats as revealed by in situ hybridization / C. N. Mowa, T. J. Iwanaga // *Endocrin.* — 2000. — V. 165. — P.59–66.

143. Bao B. Estrogen receptor- β expression in relation to the expression of luteinizing hormone receptor and cytochrome P450 enzymes in rat ovarian follicles / B. Bao, N. Kumar, R. M. Karp, H. A. Garverick, et al. // *Biol. Reprod.* 2000. — V. 63. — P. 1747–1755.

144. Byers M. Estrogen receptor- β mRNA expression in rat ovary: down-regulation by gonadotropins / M. Byers, G. Kuiper, J. Gustafsson, O. Park-Sarge. // *Mol. Endocrinol.* — 1997. — V. 11. — P. 172–182.

145. Palter S. F. Estrogens of Import to Primate / Human Ovarian Folliculogenesis / S. F. Palter, A. B. Tavares, A. Hourvitz, J. D. Veldhuis, et al. // *Endocrin. Reviews.* — V. 22, № 3. — P. 389–424.

146. Flouriot G. Differentially expressed messenger RNA isoforms of the human estrogen receptor- α gene are generated by alternative splicing and promoter usage / G. Flouriot, C. Griffin, M. Kenealy, V. Sonntag-Buck, et al. // *Mol. Endocrin.* — 1998. — V. 12. — P. 1939–1954.

147. Taylor A. H. Immunolocalisation of oestrogen receptor β in human tissues / A. H. Taylor, F. Al-Azzawi // *J. Mol. Endocrin.* — 2000. — V. 24. — P. 145–155.

148. Pelletier G. Immunocytochemical localization of estrogen receptors α and β in the human reproductive organs / G. Pelletier, M. El-Alfy // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2000. — V. 85. — P. 4835–4840.

149. Chiang C. Hormonal regulation of estrogen receptor alpha and beta gene expression in human granulosa-luteal cells in vitro / C. Chiang, K. Cheng, S. Igarashi, P. Nathwani, et al. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2000. — V. 85. — P. 3828–3839.

150. Smith C. L. Modulation of the ligand-independent activation of the human estrogen receptor by hormone and antihormone / C. L. Smith, O. M. Conneely, B. W. O'Malley // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1993. — V.90. — P. 6120–6124.

151. Bunone G. Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation / G. Bunone, P. A. Briand, R. J. Miksicek, D. Picard // *EMBO J.* — 1996. — V. 15. — P. 2174–2183.

152. Aronica S. M. Stimulation of estrogen receptor-mediated transcription and alteration in the phosphorylation state of the rat uterine estrogen receptor by estrogen, cyclic adenosine monophosphate, and insulin-like growth factor-I / S. M. Aronica, B. S. Katzenellenbogen // *Mol. Endocrinol.* — 1993. — V. 7. — P. 743–752.
153. Willis D. Premature response to LH of granulosa cells from anovulatory women with polycystic ovaries: relevance to mechanism of anovulation / D. Willis, H. Watson, D. Mason, et al // *J. Clin. Endocrin. Metab.* — 1998. — V. 83. — P. 3984–3991.
154. Harlow C. R. Androgen modulation of follicle-stimulating hormone-induced granulosa cell steroidogenesis in the primate ovary / C. R. Harlow, S. G. Hillier, J. K. Hodges // *Endocrin.* — 1986. — V. 119. — P. 1403–1405.
155. LaVoie H. Concerted regulation of low density lipoprotein receptor gene expression by FSH and IGF-I in porcine granulosa cells: promoter activation, mRNA stability, and sterol feedback / H. LaVoie, R.N. Day, J.C. Garmey, J. D. Veldhuis // *Endocrin.* — 1999. — V. 140. — P. 178–186.
156. Garmey J. Mechanisms of regulation of ovarian sterol metabolism by insulin-like growth factor type II (IGF-II): in vitro studies with swine granulosa cells / J. Garmey, R. Day, K. Day, J. Veldhuis // *Endocrin.* — 1993. — V. 133. — P. 800–808.
157. LaVoie H. Concerted regulation of low density lipoprotein receptor gene expression by FSH and IGF-I in porcine granulosa cells: promoter activation, mRNA stability, and sterol feedback / H. LaVoie, R. Day, J. Garmey, J. Veldhuis // *Endocrin.* — 1999. — V. 140. — P. 178–186.
158. Veldhuis J. D. Synergistic actions of estradiol and the insulin-like growth factor, somatomedin C, on swine ovarian (granulosa) cells / J. D. Veldhuis, R. J. Rodgers, R. W. Furlanetto // *Endocrin.* — 1986. — V. 119. — P. 530–538.
159. Veldhuis J. Interactions among endocrine control systems in the regulation of ovarian function / J. Veldhuis // *Clin. Biochem.* — 1981. — V. 14. — P. 252–258.
160. Conley A. J. The role of cytochrome P450 17 α -hydroxylase and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in the integration of gonadal and adrenal

steroidogenesis via the $\Delta 5$ and $\Delta 4$ pathways of steroidogenesis in mammals / A. J. Conley, I. M. Bird // *Biol. Reprod.* — 1997. — V.56. — P. 789–799.

161. Chaffin C. L. Hormonal regulation of steroidogenic enzyme expression in granulosa cells during the peri-ovulatory interval in monkeys / C. L. Chaffin, G. Dissen, R. Stouffer // *Mol. Hum. Reprod.* — 2000. — V. 6, №1. — P. 11–18.

162. Duleba A. J. Divergent mechanisms regulate proliferation/survival and steroidogenesis of theca-interstitial cells / A. J. Duleba, R. Z. Spaczynski, D. L. Olive, H. R. Behrman // *Mol. Hum. Reprod.* — 1999. — V. 5. — P. 193–198.

163. Gore-Langton P. Follicular steroidogenesis and its control / P. Gore-Langton, D. Armstrong, E. Knobil, J. Neill // *The Physiol. of Reprod.*, New York: Raven. Press, 1988. — V. 1. — P. 331–387.

164. Kurita T. Paracrine regulation of apoptosis by steroid hormones in the male and female reproductive system / T. Kurita, Y. Z. Wang, A. A. Donjacour, C. Zhao, et al. // *Cell. Death. Differ.* — 2001. — V. 8. — P. 192–200.

165. Kurita T. Regulation of progesterone receptors and decidualization in uterine stroma of the estrogen receptor-alpha knockout mouse / T. Kurita, K. Lee, P. T. Saunders, P. S. Cooke, et al. // *Biol. Reprod.* — 2001. — V. 64. — P. 272–283.

166. Spencer T. E. Progesterone and placental hormone actions on the uterus: insights from domestic animals / T. E. Spencer, G. A. Johnson, R. C. Burghardt, F. W. Bazer // *Biol. Reprod.* — 2004. — V. 71. — P. 2–10.

167. O'Malley B. A life-long search for the molecular pathways of steroid hormone action / B. O'Malley // *Mol. Endocrin.* — 2005. — V. 19. — P. 1402–1411.

168. Rothchild I. The corpus luteum revisited: are the paradoxical effects of RU486 a clue to how progesterone stimulates its own secretion? / I. Rothchild // *Biol. Reprod.* — 1996. — V. 55. — P. 1–4.

169. Peluso J. Expression and function of PAIRBP1 within gonadotropin-primed immature rat ovaries: PAIRBP1 regulation of granulosa and luteal cell viability / J. Peluso, A. Pappalardo, R. Losel // *Biol. Reprod.* — 2005. — V. 73. — P. 261–270.

170. Svensson E. C. Progesterone receptor-mediated inhibition of apoptosis in granulosa cells isolated from rats treated with human chorionic gonadotropin /

- E. C. Svensson, E. Markström, M. Andersson, H. Billig // *Biol. Reprod.* — 2000. — V. 63. — P.1457–1464.
171. Hirshfield A. Stathmokinetic analysis of granulosa cell proliferation in antral follicles of cyclic rats / A. Hirshfield // *Biol. Reprod.* — 1984. — V. 31. — P. 52–58.
172. Pedersen T. Follicular growth in the mouse ovary / T. Pedersen, J. Biggers, Schuetz // *Oogenesis.* — Baltimore: University Park Press, 1972. — P. 361–376.
173. Schreiber J. R. Progestins inhibit FSH-stimulated steroidogenesis in cultured rat granulosa cells / J. R. Schreiber, K. Nakamura, G. F. Erickson // *Mol. Cell. Endocrin.* — 1980. — V. 19. — P. 165–173.
174. Fortune J. E. Progesterone inhibits the induction of aromatase activity in rat granulosa cells in vitro / J. E. Fortune, S. E. Vincent // *Biol. Reprod.* — 1983. — V. 28. — P.1078–1089.
175. Luciano A. M. Effect of in vivo gonadotropin treatment on the ability of progesterone, estrogen, and cyclic adenosine 5'-monophosphate to inhibit insulin-dependent granulosa cell mitosis in vitro / A. M. Luciano, J. J. Peluso // *Biol. Reprod.* — 1995. — V. 53. — P. 664–669.
176. Peluso J. J. Progesterone mediates its anti-mitogenic and anti-apoptotic actions in rat granulosa cells through a progesterone-binding protein with gamma aminobutyric acidA receptor-like features / J. J. Peluso, A. Pappalardo // *Biol. Reprod.* — 1998. — V. 58. — P. 1131–1137.
177. Peluso J. Expression and function of PAIRBP1 within gonadotropin-primed immature rat ovaries: PAIRBP1 regulation of granulosa and luteal cell viability / J. Peluso, A. Pappalardo, R. Losel // *Biol. Reprod.* — 2005. — V. 73. — P. 261–270.
178. Svensson E. C. Progesterone receptor-mediated inhibition of apoptosis in granulosa cells isolated from rats treated with human chorionic gonadotropin / E. C. Svensson, E. Markström, M. Andersson, H. Billig // *Biol. Reprod.* — 2000. — V. 63. — P. 1457–1464.
179. Makrigiannakis A. Progesterone is an autocrine/paracrine regulator of human granulosa cell survival in vitro / A. Makrigiannakis, G. Coukos, M. Christofidou, S. Montas, et al. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 2000. — V. 900. — P. 16–25.

180. Shao R. Expression of progesterone receptor (PR) A and B isoforms in mouse granulosa cells: stage-dependent PR-mediated regulation of apoptosis and cell proliferation / R. Shao, E. Markstrom, P. Friberg, M. Johansson, et al. // *Biol. Reprod.* — 2003. — V. 68. — P. 914–921.
181. Richards J. S. Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation, and luteinization / J. S. Richards, D. L. Russell, S. Ochsner, M. Hsieh, et al. // *Recent. Prog. Horm. Res.* — 2002. — V. 57. — P. 195–220.
182. Espey L. L. Temporal and spatial patterns of ovarian gene transcription following an ovulatory dose of gonadotropin in the rat / L. L. Espey, J. S. Richards // *Biol. Reprod.* — 2002. — V. 67. — P. 1662–1670.
183. Goyeneche A. A. Progesterone promotes survival of the rat corpus luteum in the absence of cognate receptors / A. A. Goyeneche, R. P. Deis, G. Gibori, C. M. Telleria // *Biol. Reprod.* — 2003 — V. 68. — P. 151–158.
184. Rueda B. Decreased progesterone levels and progesterone receptor antagonists promote apoptotic cell death in bovine luteal cells / B. Rueda, I. Hendry, I. Hendry, F. Stormshak, et al. // *Biol. Reprod.* — 2000. — V. 62. — P. 269–276.
185. Okuda K. Progesterone is a suppressor of apoptosis in bovine luteal cells / K. Okuda, A. Korzekwa, M. Shibaya, S. Murakami, et al. // *Biol. Reprod.* — 2004. — V. 71. — P. 2065–2071.
186. Lydon J. P. Reproductive phenotypes of the progesterone receptor null mutant mouse / J. P. Lydon, F. J. DeMayo, O. M. Conneely, B. W. O'Malley // *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* — 1996. — V. 56. — P.67–77.
187. Peluso J. J. Progesterone as a regulator of granulosa cell viability / Peluso J. J. // *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* — 2003. — V. 85. — P. 167–173.
188. Goyeneche A. A. Progesterone promotes survival of the rat corpus luteum in the absence of cognate receptors / A. A. Goyenech, R. P. Deis, G. Gibori, C. M. Telleria // *Biol. Reprod.* — 2003. — V. 68. — P. 151–158.
189. McRae R. S. Changes in mouse granulosa cell gene expression during early luteinization / R. S. McRae, H. M. Johnston, M. Mihm, P. J. O'Shaughnessy // *Endocrin.* — 2005. — V. 146. — P. 309–317.

190. Bramley T. Non-genomic progesterone receptors in the mammalian ovary: some unresolved issues / T. Bramley // *Reprod.* — 2003. — V. 125. — P. 3–15.
191. Peluso J. Expression and function of PAIRBP1 within gonadotropin-primed immature rat ovaries: PAIRBP1 regulation of granulosa and luteal cell viability / J. Peluso, A. Pappalardo, R. Losel // *Biol. Reprod.* — 2005. — V. 73. — P. 261–270.
192. Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses / A. Gougeon // *Endocrin. Rev.* — 1996. — V. 17. — P. 121–155.
193. Raga F. Human oviductal gonadotrophin releasing hormone: possible implications in fertilisation, early embryonic development and implantation / F. Raga, E. Casan, F. Bonilla, et. al. // *Hum. Reproduc.* — 1999. — V. 14. — P. 16.
194. Samaras S. E. Regulation of insulin-like growth factor I biosynthesis in porcine granulosa cells / S. E. Samaras, S. F. Canning, J. A. Barber, F. A. Simmen, et al. // *Endocrin.* — 1996. — V. 137. — P. 4657–4664.
195. Morbeck D. Response of porcine granulosa cells isolated from primary and secondary follicles to FSH, 8-bromo-cAMP and epidermal growth factor in vitro / D. Morbeck, W. Flowers, J. Britt // *J. Reprod. Fertil.* — 1993. — V. 99. — P. 577–584.
196. Guidice L. C. Insulin-like growth factors and ovarian follicular development / L. C. Guidice // *Endocrin. Rev.* — 1992. — V. 13. — P. 641–669.
197. Yuan W. Insulin-like growth factor-II mediates the steroidogenic and growth promoting actions of follicle stimulating hormone on human ovarian pre-antral follicles cultured in vitro / W Yuan, L. C Guidice // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 1999. — V. 84. — P. 1479–1482.
198. Luigi D. Insulin and insulin-like growth factor-I and- II modulate human granulosa–lutein cell steroidogenesis: enhancement of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) expression / D. Luigi, L. K. Christenson, J. M. McAllister, A. Makrigiannakis // *Mol. Hum. Reprod.* — 1999. — Vol. 5, №11. — P. 1003–1010.
199. Kol S. Insulin-like growth factor I affects the intraovarian interleukin-1 system: evidence for suppression of type I interleukin-1 receptor expression and enhancement

- of secretory phospholipase A2 expression and activity / S. Kol, I. Ben-Shlomo, M. Ando, E. Y. Adashi // *Mol. Hum. Reprod.* — 1997. — V. 3. — P. 1095–1099.
200. Mason H. D. Insulin like growth factor (IGF) I and II, IGF-binding protein proteases are produced by theca and stroma of normal and polycystic ovaries / H. D. Mason, S. C. Cwyfan-Hughes, G. Heinrich, et al. // *J. Clin. Endocrin. Metab.* — 1996. — V. 81. — P. 276–284.
201. De Neubourg D. Quantification of insulin-like growth factor I receptors on granulosa cells with flow cytometry after follicular stimulation / D. De Neubourg, A. Robins, S. Fishel, L. Delbeke // *Hum. Reprod.* — 1998. — V. 13. — P. 161–164.
202. Mimuro T. The somatostatin analogue, octreotide, modifies both steroidogenesis and IGFBP-1 secretion in human luteinizing granulosa cells / T. Mimuro, H. Smith, M. Iwashita // *Hum. Reprod.* — 1998. — V. 13. — P. 150–153.
203. Willis D. Insulin action in human granulosa cells from normal and polycystic ovaries is mediated by the insulin receptor and not the type-I insulin like-growth factor receptor / D. Willis, S. Franks // *Clin. Endocrinol. Metab.* — 1995. — V. 80. — P. 3788–3790.
204. Adashi E. Y. Insulin-like growth factor-1 as an amplifier of follicle-stimulating hormone action: studies on the mechanism(s) and site(s) of action in cultured rat granulosa cell / E. Y. Adashi, C. E. Resnick, E. R. Hernandez, et al. // *Endocrin.* — 1998. — Vol. 122. — P. 1583–1591.
205. de Moura M. Insulin-like growth factor I-mediated amplification of follicle-stimulating hormone-supported progesterone accumulation by cultured rat granulosa cells: Enhancement of steroidogenesis enzyme activity and expression / M. de Moura, D. Choi, E. Adashi, et al. // *Biol. Reprod.* — 1997. — V. 56. — P. 946–953.
206. Stocco D. M. Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells / D. M. Stocco, B. J. Clark // *Endocr. Rev.* — 1996. — V. 17. — P. 221–244.
207. Strauss J. F. The steroidogenic acute regulatory protein (StAR): a window into the complexities of intracellular cholesterol trafficking / J. F. Strauss, C. Kallen, L. K. Christenson, et al. // *Rec. Progr. Horm. Res.* — 1999. — V. 54. — P. 369–395.

208. F. Arakane. Phosphorylation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) modulates its steroidogenic activity / F. Arakane, S. King, Y. Du, et al. // *J. Biol. Chem.* — 1997. — V. 32. — P. 656–662.
209. Miller W. L. Molecular biology of steroid hormone synthesis / W. L. Miller // *Endocr. Rev.* — 1988. — V. 9. — P. 9255–318.
210. LaVoie H. A. Mechanisms of insulin-like growth factor I augmentation of follicle-stimulating hormone-induced porcine steroidogenic acute regulatory protein gene promoter activity in granulosa cells / H. A. LaVoie, J. C. Garney, J. D. Veldhuis // *Endocrin.* — 1999. — V. 140. — P. 146–153.
211. Willis D. Developmentally regulated responses of human granulosa cells to insulin-like growth factors (IGFs): IGF-I and IGF-II action mediated via the Type-I receptor / D. Willis, H. Manson, H. Watson // *J. Clin. Endocrin. Metab.* — 1998. — V. 83. — P. 1256–1259.
212. Franks S. Follicular dynamics in the polycystic ovary syndrome / S. Franks, H. Mason, D. Willis // *Mol. and Cel. Endocrin.* — 2000. — V. 163. — P. 49–52.
213. Willis D. Modulation by insulin of follicle stimulating and luteinizing hormone action in human granulosa cells of normal and polycystic ovaries / D. Willis, H. Mason, C. Gilling-Smith, S. Franks // *J. Clin. Endocrinol. // Metab.* — 1996. — V. 81. — P. 302–309.
214. Erickson G. F. The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle / G. F. Erickson, S. Shimasaki // *Reprod. Biol. Endocrin.* — 2003. — V. 1. — P. 9.
215. Shimasaki S. The role of bone morphogenetic proteins in ovarian function / S. Shimasaki, R. Moore, G. Erickson et al. // *Reprod.* — 2003. — V. 61. — P. 323–337.
216. Shimasaki S. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction / S. Shimasaki, R. Moore, F. Otsuka, G. Erickson // *Endocr. Rev.* — 2004. — V. 25. — P. 72–101.

217. Lee W. The effect of bone morphogenetic protein-7 on folliculogenesis and ovulation in the rat / W. Lee, F. Otsuka, R. K. Moore, S. Shimasaki // *Biol. Reprod.* — 2001. — V. 65. — P. 994–999.
218. Souza C. J. Effect of bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on oestradiol and inhibin A production by sheep granulosa cells, and localization of BMP receptors in the ovary by immunohistochemistry / C. J. Souza, B. K. Campbell, A. S. McNeilly, D. T. Baird // *Reprod.* — 2002. — V.123. — P. 363–369.
219. Otsuka F. Biological function and cellular mechanism of bone morphogenetic protein-6 in the ovary / F. Otsuka, R. Moore, S. Shimasaki // *J. Biol. Chem.* — 2001. — V. 276. — P. 32889–32895.
220. Otsuka F. Bone morphogenetic protein-15 inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action by suppressing FSH receptor expression / F. Otsuka, S. Yamamoto, G. F. Erickson // *J. Biol. Chem.* — 2001. — V. 276. — P. 11387–11392.
221. Vitt U. A. Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles / U. A. Vitt, M. Hayashi, C. Klein, A. J. Hsueh // *Biol. Reprod.* — 2000. — V. 62. — P. 370–377.
222. Erickson G. F. The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle / G. F. Erickson, S. Shimasaki // *Reprod. Biol. Endocrin.* — 2003. — P. 1–9.
223. Gueripel X. Sequential gonadotropin treatment of immature mice leads to amplification of transforming growth factor beta action, via upregulation of receptor-type 1, Smad 2 and 4, and downregulation of Smad 6 / X. Gueripel, M. Benahmed, A. Gougeon // *Biol. Reprod.* — 2004. — V. 70. — P. 640–648.
224. Miyoshi T. Mutual Regulation of Follicle-Stimulating Hormone Signaling and Bone Morphogenetic Protein System in Human Granulosa Cells / T. Miyoshi, F. Otsuka, J. Suzuki, et al. // *Biol. Reprod.* — 2006. — V. 74. — P. 1073–1082.
225. Massague J. Controlling TGF-beta signaling / J. Massague, Y. Chen // *Genes and Develop.* — 2000. — V. 14. — P. 627–644.
226. Chang H. Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta

- superfamily / H. Chang, C. Brown, M. Matzuk // *Endocrin. Rev.* — 2002. — V. 23. — P. 787–823.
227. Feng X. H. Specificity and versatility in *tgf-beta* signaling through Smads / X. H. Feng, R. Derynck // *Annual. Review. of Cell. and Develop. Biol.* — 2005. — V. 21. — P. 659–693.
228. Jones R. L. TGF-beta superfamily expression and actions in the endometrium and placenta / R. L. Jones, C. Stoikos, J. K. Findlay, L. A. Salamonsen // *Reprod.* — 2006. — V. 132. — P. 217–232.
229. Massague J. TGF-beta signal transduction / J. Massague // *An. Rev. of Biochem.* — 1998. — V. 67. — P. 753–791.
230. Peng C. The TGF-beta superfamily and its roles in the human ovary and placenta / C. Peng // *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada.* — 2003. — V. 25. — P. 834–844.
231. Miyazawa K. Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling. / K. Miyazawa, M. Shinozaki, T. Hara, T. Furuya // *Gen. to Cel.* — 2002. — V. 7. — P. 1191–1204.
232. Wang H. Role and regulation of nodal/activin receptor-like kinase 7 signaling pathway in the control of ovarian follicular atresia / H. Wang, J. Jiang, C. Zhu, C. Peng, et al. // *Mol. Endocrin.* — 2006. — V. 20. — P. 2469–2482.
233. Asselin E. X-linked inhibitor of apoptosis protein activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in rat granulosa cells during follicular development / E. Asselin, Y. Wang, B. Tsang // *Endocrin.* — 2001. — V. 142. — P. 2451–2457.
234. Deveraux Q. L. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases / Q. L. Deveraux, R. Takahashi, G. S. Salvesen, J. C. Reed // *Nature.* — 1997. — V. 388. — P. 300–304.
235. Deveraux Q. L. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases / Q. L. Deveraux, N. Roy, H. R. Stennicke, T. Van Arsdale, et al. // *EMBO J.* — 1998. — V. 17 — P. 2215–2223.

236. Chung J. Integrin (alpha 6 beta 4) regulation of eIF-4E activity and VEGF translation: a survival mechanism for carcinoma cells / J. Chung, R. Bachelder, E. Lipscomb, L. Shaw, et al. // *J. of Cell Biol.* — 2002. — V. 158 — P. 165–174.
237. Yadaa H. Role of Ovarian Theca and Granulosa Cell Interaction in Hormone Production and Cell Growth During the Bovine Follicular Maturation Process / H. Yadaa, K. Hosokawa, K. Tajima, et al // *Biol. of Reprod.* — 1999. — V.61. — P. 1480–1486.
238. Thanki K. H. Effects of Follicle-Stimulating Hormone and Estradiol upon Progesterone Secretion by Porcine Granulosa Cells in Tissue Culture / K. H. Thanki, C. P. Channing // *Endocrin.* 1978. — V. 103, №. 1 — P. 74–80.
239. Febbraio M. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism / M. Febbraio, D. P. Hajjar, R. L. Silverstein // *J. Clin. Invest.* — 2001. — V. 108, № 6. — P. 785–791.
240. Perlman S. Transcriptome analysis of FSH and FSH variant stimulation in granulosa cells from IVM patients reveals novel regulated genes / S. Perlman, T. Bouquin, B. Van den Hazel, T. H. Jensen, et al. // *Mol. Hum. Reprod.* — 2006. — V. 12, № 3. — 135–144.
241. Schube U. Resveratrol and Desferoxamine Protect Human OxLDL-Treated Granulosa Cell Subtypes From Degeneration / U. Schube, M. Nowicki, P. Jogschies, et al. // *J. Clin. Endocrin. Metab.* — 2014. — V. 99, № 1. — P. 229–239.
242. Rice S. Franks Impaired insulin-dependent glucose metabolism in granulosa-lutein cells from anovulatory women with polycystic ovaries / S. Rice, N. Christoforidis, C. Gadd, D. Nikolaou, et al. // *Hum. Reprod.* — 2005 — V. 20, №2. — P. 373–381.
243. Harris S. E. Carbohydrate metabolism by murine ovarian follicles and oocytes grown in vitro / S. E. Harris, I. Adriaens, H. J Leese, R. G. Gosden // *Reprod.* — 2007. — V. 134. — P. 415–424.
244. Valko M. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease / M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncola, M. Mazura, et al. // *J. Biochem. Cell. Biol.* — 2007. — V. 39. — P. 44–84.

245. Seino T. Eight-hydroxy-2-deoxyguanosine in granulosa cells is correlated with the quality of oocytes and embryos in an in vitro fertilization–embryo transfer program / T. Seino, H. Saito, T. Kaneko, T. Takahashi, et al. // *Fertil. Steril.* — 2002. — V. 77. — P. 1184–1190.
246. Jancar N. Effect of apoptosis and reactive oxygen species production in human granulosa cells on oocyte fertilization and blastocyst development / N. Jancar, A. Kopitar, A. Ihan, I. Klun, et al. // *J. Assist. Reprod. Genet.* — 2007. — V. 24 — P. 91–97.
247. Matos L. Superoxide dismutase expression in human cumulus oophorus cells / L. Matos, D. Stevenson, F. Gomes, J. Silva-Carvalho, et al. // *Mol. Hum. Reprod.* — 2009. — V. 15, № 7. 411–419.
248. Ortega-Camarillo C. Changes in the glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in granulosa cells during follicular atresia in ewes / C. Ortega-Camarillo, A. González-González, M. Vergara-Onofre, E. González-Padilla, et al. // *Reprod.* — 2009. — V. 137 — P.979–986.
249. Serke H. Granulosa Cell Subtypes Vary in Response to Oxidized Low-Density Lipoprotein as Regards Specific Lipoprotein Receptors and Antioxidant Enzyme Activity / H. Serke, J. Bausenwein, J. Hirrlinger, M. Nowicki, et al. // *J. Clin. Endocrin. Metab.* — 2010. — V. 95, № 7. — P. 3480–3490.
250. Devine P. J. Roles of Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Ovarian Toxicity / P. J. Devine, S. D. Perreault, U. Luderer // *Biol. Reprod.* — 2012. — V. 86, № 2. — P. 27.
251. Combelles C. M. H. Profiling of superoxide dismutase isoenzymes in compartments of the developing bovine antral follicles / C. M. H. Combelles, E. Holick, L. Paoletta, et al. // *Reprod.* — 2010. — V. 139. — P. 871–881.
252. Wu Q. Q. Characterization of the Catalase and Glutathione Peroxidase-1 Antioxidant System During Bovine Folliculogenesis / Q. Q. Wu, C. Lam, D. Poljak, G. M. Van Deventer, et al. // *Biol. of Reprod.* — 2009. — V. 81. — P. 581.

253. Giergiel M. Age-related Changes in Activity of Catalase in Selected Bovine Muscles / M. Giergiel, M. Jamiol, J. Wawrzykowski, M. Kankofer // *Acta Scientiae Veterinariae*. — 2015. — V. 43. — P. 1285–1292
254. Гузеватий О. Є. Оцінка функціонального стану ооцит-кумулясних комплексів корів залежно від типу яєчника / О. Є. Гузеватий, В. В. Ясінський, Л. В. Смулка та ін. // *Вісник аграрної науки*. — 1995. — № 11. — С. 94–98.
255. Лукьянова Л. Д. Кислородзависимые процессы в клетке и ее функциональное состояние / Л. Д. Лукьянова, Б. С. Балмуханов, Л. Т. Уголев. М.: Наука., 1982. — 262 с.
256. Lowry O. H. Protein measurement with Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Fair, R. J. Randall // *J. Biol. Chem.* — 1951. — V. 193, №1. — P. 264–275.
257. Практическое руководство по энзимологии. — М.: Высшая школа, 1980. — С. 380.
258. Garbus J. Serum malate dehydrogenase isoenzymes as indicators of severe cellular injury / J. Garbus // *Clin. Chim. Acta*. — 1971. — V. 35. — P. 502–504.
259. Гааль Э. Электрофорез в разделении биологических макромолекул / Э. Гааль, Г. Медьши, Л. Верецки. — М: Мир, 1982. — 446 с.
260. Чевари С. Н. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте / С. Н. Чевари, Т. А. Андян, Я. И. Штрэнгер // *Лаб. дело*. — 1991. — № 10. — С. 9–13.
261. Beauchamp C. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels / C. Beauchamp, I. Fridovich // *Anal. Biochem.* — 1971. — V. 44. — P. 276–287.
262. Кузьміна Н. В. Активність супероксиддисмутази і глутатіонпероксидази в різних органах і крові корів / Н. В. Кузьміна, Д. Д. Остапів // *Біологія тварин*. — 2008. — Т. 12. — С. 423 – 429.
263. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині: довідник / В. В. Влізло, Р. С. Федорук, І. Б. Ратич, та ін.; за ред. В. В. Влізло — Львів: Сполом, 2012. — 764 с.

264. Королюк М. А. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова, В. Е. Токарев // Лаб. дело. — 1991. — №12. — С. 16–19.
265. Wodbury W. An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes / W. Wodbury, A. K. Spencer, M. A. Stahmann // *Analyt. Biochem.* — 1971. — V. 44, №. 1. — P. 301–305.
266. Моим В. М. Простой и специфический метод определения глутатионпероксидазы в эритроцитах // Лаб. дело. — 1986. — №12. — С.724–727.
267. Lin C. L. Activity staining of glutathione peroxidase after electrophoresis on native and sodium dodecylsulfate polyacrylamide gels / C. L. Lin, H. J. Chen, W. C. Hou // *Electrophoresis.* — 2002. — V. 23. — P. 513–516.
268. Weydert C. J. Measurement of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue / C. J. Weydert, J. J. Cullen // *Nat. Protoc.* — 2010. — V. 5, №1. —P. 51–66.
269. Плохинский Н. А. Биометрия. — М.: МГУ. — 1970. — С. 53–60.
270. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease / B. Halliwell. // *American. J. of Medicine.* — 1991. — V. 91. — P. 14– 22.
271. Hu Y. Eichenlaub-Ritter Effects of low O₂ and ageing on spindles and chromosomes in mouse oocytes from pre-antral follicle culture / Y. Hu, I. Betzendah, R. Cortvrindt, J. Smitz, et al. // *Hum. Reprod.* — 2001. — V.16, № 4. — P. 737–748.
272. Smitz J. Normal oxygen atmosphere is essential for the solitary long-term culture of early preantral mouse follicles / J. Smitz // *Mol. Reprod.* — 1996. — Dev. 45. — P. 466–475.
273. Gigli I. Effects of oxygen tension and supplements to the culture medium on activation and development of bovine follicles in vitro / I. Gigli, D. D. Byrd, J. E. Fortune // *Theriogenology* — 2006., № 66. — P. 344–353.

274. 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, L. R. Faustino, et al. // *Anim. Reprod. Sci.* — 2010. — V. 117. — P. 83–89.
275. Боднар Ю. В. Інтенсивність окисних процесів у клітинах гранульози при культивуванні / Ю. В. Боднар // *Науковий вісник ЛНУВМ та БТ ім. С. З. Гжицького.* — 2009. — Т. 11, №3(42), Частина 2. — С. 11–14.
276. 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.
277. Боднар Ю. В. Особливості окисних процесів у клітинах гранульози при культивуванні / Ю. В. Боднар, Д. Д. Остапів, Р. Г. Сачко, О. С. Грабовська, та ін. // *Науково-технічний бюлетень Інституту біології тварин та ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок.* — Львів, 2010. — Вип. 11, № 1. — С. 18–23.
278. 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.
279. 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. Фізіологічний журнал.* — 2010. — Т. 56, №2. — С. 292–293.
280. Wise T. Biochemical analysis of bovine follicular fluid: albumin, total protein, lysosomal enzymes, ions, steroids and ascorbic acid content in relation to follicular size, rank, atresia classification and day of estrous cycle / T. Wise // *J. Anim. Sci.* — 1987. — V. 64, № 4. — P. 1153–69.
281. 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 // *Reprod.* — 2004. — V. 128. — P.313–319.

282. Preis K. A. Metabolic markers of developmental competence for in vitro-matured mouse oocytes / K. A. Preis, G. J. Seidel, D. K. Gardner // *Reprod.* — 2005. — V. 130. — P.475–483.
283. Zheng P. Latham Effects of in vitro oocyte maturation and embryo culture on the expression of glucose transporters, glucose metabolism and insulin signaling genes in rhesus monkey oocytes and preimplantation embryos / P. Zheng, R. Vassena, K. Latham // *Molec. Hum. Reprod.* — 2007. — V. 13. №6. — P. 361–371.
284. Harris S. E. Pyruvate and oxygen consumption throughout the growth and development of murine oocytes / S. E. Harris, H. J. Leese, R. G. Gosden, H. M. Picton // *Mol. Reprod. Dev.* — 2009. — V. 76. — P. 231–238.
285. Collado-Fernandez E. Metabolism throughout follicle and oocyte development in mammals / E. Collado-Fernandez, H. M. Picton, R. Dumollard // *Int. J. Dev. Biol.* — 2012. — V. 56. — P.799–808.
286. 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 та ін. // *Науково-технічний бюлетень ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок та Інституту біології тварин.* – Львів, 2014. – Вип. 15, № 4. – С. 10–15.
287. Боднар Ю. Активність і вміст ізоформ малатдегідрогенази у культурі клітин гранульози яєчників корів / Ю. Боднар, Н. Кузьміна, Р. Сачко, Д. Остапів // *Молодь і поступ біології.* — Львів, 2015. — С. 437–438.
288. Kwon H. Effects of low oxygen condition on the generation of reactive oxygen species and the development in mouse embryos cultured in vitro / H. Kwon, H. Yang, K. Hwang, et al // *Obstet. Gynaecol. — Res.* — 1999. — V. 25. — P. 359 – 366.
289. Hensley K. Oxygen species, cell signalling and cell injury / K. Hensley, K. Robinson, S. Garitta, S. Salsman // *Free Rad. Biol. Med.* — 2000. — V. 28. — P. 1456–1462.
290. Zeron Y. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles /

- Y. Zeron, A. Ocherentny, O. Kedar, A. Borochoy, et al. // *Reprod.* — 2001. — V. 121. — P. 447–454.
291. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function / W. Droge // *Physiol. Rev.* — 2002. — V. 82. — P. 47–95.
292. Lenzi A. Polyunsaturated fatty acids of germ cell membranes, glutathione and blutathione-dependent enzyme-PHGPx: from basic to clinic / A. Lenzi, L. Gandini, F. Lombardo, M. Picardo et al. // *Contraception.* — 2002. — V. 65. — P. 301–304.
293. Devine P. J. Ulrike Luderer Roles of Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Ovarian Toxicity / P. J. Devine, S. D. Perreault // *Biol. of Reprod.* — 2012. — V. 86. — P. 2–27.
294. Friedman C. Follicular fluid vascular endothelial growth factor concentrations are elevated in women of advanced reproductive age undergoing ovulation induction / C. Friedman, D. R. Danforth, C. Herbosa-Encarnacion, L. Arbogast, et. al. // *Fertil. Steril.* — 1997. — V. 68. — P. 607–612.
295. Schreck R. A role for oxygen radicals as second messenger / R. Schreck, P. A. Baeuerle // *Trends. Cell. Biol.* — 1991. — V. 1. — P. 39–42.
296. Combelles C. Profiling of superoxide dismutase isoenzymes in compartments of the developing bovine antral follicles / C. Combelles, E. Holick, L. Paoella, D. Walker, et al. // *Reprod.* — 2010. — V. 139. — P. 871–881.
297. 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 та ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок.* — Львів, 2014. — Вип. 15, № 2, 3. — С. 16–22.
298. Acevedo N. Insulin Signaling in Mouse Oocytes / N. Acevedo, J. Ding, G. D. Smith // *Biol. Reprod.* — 2007. — V. 77.— P. 872–879.
299. Han M. Effects of BSA and Fetal Bovine Serum in Culture Medium on Development of Rat Embryos / M. Han, K. Niwa // *J. Reprod. Dev.* — 2003. — V. — 49. — P. 235–242.

300. Leibfried-Rutledge L. Effect of bovine and porcine follicular fluid and granulosa cells on maturation of oocytes in vitro / L. Leibfried-Rutledge, N. L. First // *Biol. Reprod.* — 1980. — V. 23. — P. 699–704.
301. Richard F. J. Effects of follicular cells on oocyte maturation II: thecal cell inhibition of bovine oocyte maturation in vitro / F. J. Richard, M. A. Sirard // *Biol. Reprod.* — 1996. — V. 54. — P. 22–28.
302. Hashimoto S. Bovine Immature Oocytes Acquire Developmental Competence During Meiotic Arrest In Vitro / S. Hashimoto, N. Minami, R. Takakura, H. Imai // *Biol. of Reprod.* — 2002. — V. 66, № 6. — P. 1696–1701.
303. Tajima K. Effects of Ovarian Theca Cells on Apoptosis and Proliferation of Granulosa Cells: Changes During Bovine Follicular Maturation / K. Tajima, M. Orisaka, K. Hosokawa, A. Amsterdam, et al. // *Biol. of Reprod.* — 2002. — V. 66, № 6. — P. 1635–1639.
304. FitzHarris G. Granulosa cells regulate oocyte intracellular pH against acidosis in preantral follicles by multiple mechanisms / G. FitzHarris, V. Siyanov, J. M. Baltz // *Development.* — 2007. — V. 134. — P. 4283–4295.
305. Боднар Ю. В. Вміст загального білка у культурі клітин гранульози / Ю. В. Боднар // *Біологія тварин.* — Львів, 2015. — Том 17, №3. — С. 150.
306. Боднар Ю. Вміст ліпідів та концентрація статевих гормонів у культурі клітин гранульози / Ю. В. Боднар, Н. В. Кузьміна, А. З. Пилипець, Р. Г. Сачко, Д. Д. Остапів. // *НТБ ДНДКІ ветеринарних препаратів та кормових добавок і Інституту біології тварин* — 2015. — Вип. 16, №2. — С.19–23.
307. 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 ЛНУВМБТ ім. С.З. Гжицького* – 2014. – Том 16. №2(59). – С. 17–23.
308. Vlizlo V. Oxygen uptake and estrogen production (synthesis) granulosa cells cultivated / V. Vlizlo, Yu. Bodnar, R. Sachko // *XXVI World Buiatrics Congress* — Santiago, Chile, 2010.

309. Matos L. Superoxide dismutase expression in human cumulus oophorus cells / L. Matos, D. Stevenson, F. Gomes, J. L. Silva-Carvalho, et al. // *Mol. Hum. Reprod.* — 2009. — V. 15, № 7. — P. 411–419.
310. Friedman C. Follicular fluid vascular endothelial growth factor concentrations are elevated in women of advanced reproductive age undergoing ovulation induction / C. Friedman, D. Danforth, C. Herbosa-Encarnacion, L. Arbogast, et al. // *Fertil. Steril.* — 1997. — V. 68. — P. 607–612.
311. Tanghe S. Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation and fertilization / S. Tanghe, A. Van Soom, H. Nauwynck, M. Coryn, et al. // *Mol. Reprod. Dev.* — 2002. — Vol. 61. — P. 414–424.
312. Mendoza C. Follicular fluid markers of oocyte developmental potential / C. Mendoza, E. Ruiz-Requena, E. Ortega, N. Cremades, et al. // *Hum. Reprod.* — 2002. — V. 17 — P. 1017–1022.
313. Skinner M. K. Regulation of primordial follicle assembly and development / M. K. Skinner // *Hum. Reprod.* — 2005. — V. 11. — P. 461–471.
314. Ruth R. Culture environment modulates maturation and metabolism of human oocytes / R. Ruth, F. Stephen, K. Hardy // *Hum. Reprod.* — 2002. — V. 17, № 11. — P. 2950–2956.
315. Zeng H.-T. Prematuration with Cyclic Adenosine Monophosphate Modulators Alters Cumulus Cell and Oocyte Metabolism and Enhances Developmental Competence of In Vitro-Matured Mouse Oocytes / H.-T. Zeng, D. Richani, M. L. Sutton-McDowall, Z. Ren, J. E.J. Smitz et al. // *Biol. Reprod.* — 2014. — V. 91, № 2. — P. 1–11.
316. Jóźwik M. Battaglia Concentrations of monosaccharides and their amino and alcohol derivatives in human preovulatory follicular fluid / M. Jóźwik, M. Jóźwik, C. Teng, F. C. Battaglia // *Mol. Hum. Reprod.* — 2007. — V. 13, №11 — P. 791–796.
317. Thompson J. G. The Ovarian Antral Follicle: Living on the Edge of Hypoxia or Not? / J. G. Thompson, H. M. Brown, K. L. Kind, D. L. Russell // *Biol. Reprod.* — 2015. — V. 92, №61. — P. 53–61.

318. Sturmeý R. G. Energy metabolism in pig oocytes and early embryos / R. G. Sturmeý, H. J. Leese // *Reprod.* —2003. — V. 126, №1. — P. 97–204.
319. Butler S. T. Energy Balance, Metabolic Status, and the First Postpartum Ovarian Follicle Wave in Cows / S. T. Butler, S. H. Pelton, W. R. Butler // *Administered Propylene Glycol J. Dairy Sci.* — 2006. — V. 89. — P. 2938–2951.
320. Rapoport R. Electron leakage from the adrenal cortex mitochondrial P450_{scc} and P450_{c11} systems: NADPH and steroid dependence / R. Rapoport, D. Sklan, I. Hanukoglu // *Arc. of Biochem. Bioph.* — 1995. — V. 317. — P. 412–416.
321. Hsueh A. J. W. Gonadal cell apoptosis / A. J. W. Hsueh, K. M. Eisenhauer, S-Y Chun, S. Y. Hsu, et al. // *Recent Progress in Hormone Research* —1996. — V. 51. — P. 433–455.
322. Tilly J. L. Apoptosis and ovarian function / J. L. Tilly // *Rev. of Reprod.* — 1996. — V. 11. — P. 62–172.
323. Scantland S. The Adenosine Salvage Pathway as an Alternative to Mitochondrial Production of ATP in Maturing Mammalian Oocytes /S. Scantland, I. Tessaro, C. H. Macabelli, A. D. Macaulay et al. // *Biol. Reprod.* —2014 . — V. 91. — P. 75–84.
324. Salplachta J. Lactate Dehydrogenase Isoenzyme Pattern in Tissues and Serum of the Calf / J. Salplachta, J. Necas // *Acta vet. Brno.* — 2000. — V. 69. — P. 267–275.
325. Sharma P. Utility of serum LDH isoforms in the assessment of mycobacterium tuberculosis induced pathology in TB patients of Sahariya Tribe / P. Sharma, S. Jain, R. Bamezai, P. Tiwari // *Indian. J. of Clinical. Biochem.* — 2010. — V. 25, № 1. — P. 57–63.
326. Wuntch Th. Lactate dehydrogenase isozymes: kinetic properties at high enzyme concentrations / Th. Wuntch, R. Chen, E. Vesell // *Science.* — 1970. — V. 167. — P.63–65.
327. Maekawa M. Electrophoretic Variant of a Lactate Dehydrogenase Isoenzyme and Selective Promoter Methylation of the LDHA Gene in a Human Retinoblastoma

Cell Line / M. Maekawa, M. Inomata, M. Sasaki, A. Kaneko, et al // *Clinical. Chem.* — 2002. — V. 48, № 11. — P. 1938–1945.

328. Goward C. R. Malate dehydrogenase: A model for structure, evolution, and catalysis / C. R. Goward, D. J. Nicholls // *Protein Science* —1994, —V 3. —P. 1883–1888.

329. Steffan J. S. Isolation and characterization of the yeast gene encoding the MDH-3 isoenzyme of malate dehydrogenase / J. S. Steffan, L. McAlister-Henn // *J. Biol. Chem.* — 1992. — V. 267, № 34. — P. 24708–24715.

330. Newton K. J. Genetic basis of the major malate dehydrogenase isozymes in maize / K. J. Newton, D. Schwartz // *Genetics.* — 1980. — V. 95. — P. 425–442.

331. Al-Harbi M. S. Tissue-specific isoenzyme variations in Arabian camel, *Camelus dromedaries* /M. S. Al-Harbi, S. A. M. Amer // *Advances in Bioscience and Biotechnology.* — 2012. — V. 3. — P. 863–868.

332. Сатар А. Ф. Кинетические характеристики тетрамерной формы малатдегидрогеназы, полученной с использованием ионообменной хроматографии из животных и бактерий / А. Ф. Сатар, И. В. Парфенова, Е. В. Мальцева, М. И. Фалалеева, та ін. // *Сорбционные и хроматографические процессы.* — 2010. — Т. 10., Вып. 2. — С. 231–236.

333. Han D. Voltage-dependent Anion Channels Control the Release of the Superoxide Anion from Mitochondria to Cytosol / D. Han, F. Antunes, R. Canali, D. Rettori // *J. Biol. Chem.* — 2003. — V. — 278. — P. 5557–5563.

334. Han D. Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space / D. Han, E. Williams, E. Cadenas // *J. Biochem.* — 2001. — V. 353. — P. 411–416.

335. St-Pierre J. Topology of Superoxide Production from Different Sites in the Mitochondrial Electron Transport Chain / J. St - Pierre, J. A. Buckingham, S. J. Roebuck, M. D. Brand // *J. Biol. Chem.* — 2002. — V. 277. — P. 44784–44790.

336. Miwa S. Superoxide and hydrogen peroxide production by *Drosophila* mitochondria / S. Miwa, J. St-Pierre, L. Partridge, M. D. Brand // *Free Radic. Biol. Med.* — 2003. — V. 35. — P. 938–948.

337. Liu Y. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain / Y. Liu, G. Fiskum, D. Schubert // *J. Neurochem.* — 2002. — V. 80. — P. 780–787.
338. Kushnareva Y. Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation–reduction state / Y. Kushnareva, A. Murphy, A. Andreyev // *Biochem. J.* — 2002. — Vol. 368. — P. 545–553.
339. Chen Q. Production of Reactive Oxygen Species by Mitochondria / Q. Chen, J. Vazquez, S. Moghaddas, C. Hoppel, et al. // Central. role of complex III // *J. Biol. Chem.* — 2003. — V. 278. — P. 36027–36031.
340. Adrian J. Brand Inhibitors of the Quinone-binding Site Allow Rapid Superoxide Production from Mitochondrial NADH: Ubiquinone Oxidoreductase (Complex I) / J. Adrian, A. Lambert, D. Martin // *J. Biol. Chem.* — 2004. — V. 279. — P. 39414–39420.
341. Musicki B. Inhibition of protein synthesis and hormone-sensitive steroidogenesis in response to hydrogen peroxide in rat luteal cells / B. Musicki, R. Aten, H. Behrman // *Endocrin.* — 1994. — V. 134. — P. 588–595.
342. Carlson J. C. Stimulation of progesterone secretion in dispersed cells of rat corpora lutea by antioxidants / J. C. Carlson, M. Sawada, D. L. Boone, J. M. Stauffer // *Steroids* — 1995. — Vol. 60. — P. 272–276.
343. Serke H. Granulosa Cell Subtypes Vary in Response to Oxidized Low-Density Lipoprotein as Regards Specific Lipoprotein Receptors and Antioxidant Enzyme Activity / H. Serke, J. Bausenwein, J. Hirrlinger, M. Nowicki, et al. // *J. Clin. Endocrin. Metab.* — 2010. — V. 95, №7. — P. 3480–3490.
344. Seaver L. C. Imlay Are Respiratory Enzymes the Primary Sources of Intracellular Hydrogen Peroxide? / L. C. Seaver, A. James // *J. Biol. Chem.* — 2004. — V. 279. — P. 48742–48750.
345. David D. Gutterman Mitochondria and Reactive Oxygen Species An Evolution in Function Circulation / D. David // *Research.* — 2005. — Vol. 97. — P. 302.

346. Galkin A. Superoxide Radical Formation by Pure Complex I (NADH:Ubiquinone Oxidoreductase) from *Yarrowia lipolytica* / A. Galkin, U. Brandt // *J. Biol. Chem.* — 2005. — V. 280. — P. 30129–30135.
347. Holick E. Profiling of the superoxide dismutase antioxidants in bovine follicular fluids from developing antral follicles / E. Holick, L. Paoletta, S. Czerniak, D. Walker, et al // *Biol. Reprod.* — 2007. — V. 77. — P. 114–114.
348. Wong H. W. G. Manganous superoxide dismutase is essential for cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor / H. W. G. Wong, J. H. Elwell, L. W. Oberley, D. V. Goeddel // *Cell.* — 1989. — V. 58. — P. 923–931.
349. Johnson F. Giulivi C Superoxide dismutases and their impact upon human health / F. Johnson // *Molec. Aspects of Medicine.* — 2005. — V. 26. — P. 340–352.
350. Nozik-Grayck E. Extracellular superoxide dismutase / E. Nozik-Grayck, H. B. Suliman, C. A. Piantadosi // *Int. J. of Biochem. and Cell. Biol.* — 2005. — V. 37. — P. 2466–2471.
351. Cullen J. J. The role of manganese superoxide dismutase in the growth of pancreatic adenocarcinoma / J. J. Cullen // *Cancer Res.* — 2003. — V. 63. — P. 1297–1303.
352. Weydert C. Suppression of the malignant phenotype in human pancreatic cancer cells by the overexpression of manganese superoxide dismutase / C. Weydert // *Mol. Cancer Ther.* — 2003. — V. 2. — P. 361–369.
353. Ough M. Inhibition of cell growth by overexpression of manganese superoxide dismutase (MnSOD) in human pancreatic carcinoma / M. Ough // *Free Radic. Res.* — 2004. — V. 38. — P. 1223–1233.
354. Austin E. J. Alterations in Intrafollicular Regulatory Factors and Apoptosis During Selection of Follicles in the First Follicular Wave of the Bovine Estrous Cycle / E. J. Austin, M. Mihm, A. C. O. Evansb, P. G. Knightc, et al // *Biol. Reprod.* — 2001. — V. 64. — P. 839–848.
355. Sugino N. Reactive oxygen species in ovarian physiology / N. Sugino // *Reprod. Med. and Biol.* — 2005. — V. 4. — P. 31–44.

356. Farina M. Probuocol Increases Glutathione Peroxidase-1 Activity and Displays Long-Lasting Protection against Methylmercury Toxicity in Cerebellar Granule Cells / M. Farina, F. Campos, I. Vendrell, J. Berenguer, et al. // *Toxicol. Sci.* — 2000. — V. 112, № 2. — P. 416–426.
357. Han D. Effect of Glutathione Depletion on Sites and Topology of Superoxide and Hydrogen Peroxide Production in Mitochondria / D. Han, R. Canali, D. Rettori, N. Kaplowitz // *Mol. Pharmacol.* — 2003. — V. 64. — P. 1136–1144.
358. Ortega-Camarillo C. Changes in the glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in granulosa cells during follicular atresia in ewes / C. Ortega-Camarillo, A. González-González, M. Vergara-Onofre, E. González-Padilla, et al. // *Reprod.* — 2009. — V. 137. — P. 979–986.
359. Tsai-Turton M. Opposing effects of glutathione depletion and FSH on reactive oxygen species and apoptosis in cultured preovulatory rat follicles / M. Tsai-Turton, U. Luderer // *Endocrin.* — 2006. — V. 147. — P. 1224–1236.
360. Tsai-Turton M. Cyclophosphamide-Induced apoptosis in COV434 human granulosa cells involves oxidative stress and glutathione depletion / M. Tsai-Turton, B. T. Luong, et al. // *Toxicol. Sciences.* — 2007. — V. 98. — P. 216–230.
361. Józwick M. Battaglia Concentrations of monosaccharides and their amino and alcohol derivatives in human preovulatory follicular fluid / M. Józwick, M. Józwick, C. Teng, C. Battaglia // *Molec. Hum. Reprod.* — 2007. — V. 13, №11. — P. 791–796.
362. Hoang Y. D. Follicle-stimulating hormone and estradiol interact to stimulate glutathione synthesis in rat ovarian follicles and granulosa cells / Y. D. Hoang, B. N. Nakamura, U. Luderer // *Biol. Reprod.* — 2009. — V. 81. — P. 636–646.
363. Ortega-Camarillo C. Changes in the glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in granulosa cells during follicular atresia in ewes / C. Ortega-Camarillo, A. González-González, M. Vergara-Onofre, E. González-Padilla, et al. // *Reprod.* — 2009. — V. 137. — P. 979–986.

364. Kelner M. Heterologous expression of selenium-dependent glutathione peroxidase afford cellular resistance to paraquat / M. Kelner, R. Bagnell, S. Uglik, M. Montoya, et al. // *Arch. Biochem. Biophys.* — 1995. — V. 323. — P. 40–46.
365. Kayanoki Y. The protective role of glutathione peroxidase in apoptosis induced by reactive oxygen species / Y. Kayanoki, J. Fujii, K. N. Islam, K. Suzuki, et al. // *J. Biochem.* — 1996. — V. 119, №4. — P. 817–22.
366. Francisco T. Freitas PEX5 Protein Binds Monomeric Catalase Blocking Its Tetramerization and Releases It upon Binding the N-terminal Domain of PEX14 / T. Francisco, T. Rodrigues, I. Alencastre, M. Pinto, et al // *The J.of Biol. Chem.* — 2011. — V. 286. — P. 40509–40519.
367. Arthur J. R. The glutathione peroxidases / J. R. Arthur // *Cell. Mol. Life Sci.* — 2000. — V. 57. — P. 1825–1835.
368. Rodgers R. Formation of the Ovarian Follicular Antrum and Follicular Fluid / R. Rodgers, H. Irving-Rodgers // *Biol. of Reprod.* — 2010. — V. 82, № 6. — P. 1021–1029.
369. Febbraio M. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism / M. Febbraio, D. P. Hajjar, R. L. Silverstein // *J. Clin. Invest.* — 2001. — V. 108, № 6. — P. 785–791.
370. Tuckey R. C. Transfer of cholesterol between phospholipid vesicles mediated by the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) / R. Tuckey, M. Headlam, H. S. Bose, W. L. Miller // *J. Biol. Chem.* — 2002. — V. 277, № 49. — P. 47123–47128.
371. Schube U. Resveratrol and Desferoxamine Protect Human OxLDL-Treated Granulosa Cell Subtypes From Degeneration / U. Schube, M. Nowicki, P. Jogschies, et al. // *J. Clin. Endocrin. Metab.* — 2014. — V. 99, № 1. — P. 229–239.
372. Goth L. Serum Catalase: Reversibly Formed Charge Isoform of Erythrocyte Catalase / L. Goth // *Clinical. Chemistry.* — 1991. — V. 37, №. 12. — P. 2043–2047.
373. Холод В. М. Белки сыворотки крови в клинической и экспериментальной ветеринарии / В. М. Холод // – М.: Ураджай. — 1983. — С. 76.

374. Beg M. A. Follicle selection in cattle and horses: role of intrafollicular factors / M. A. Beg, O. J. Ginther // *Reprod.* — 2006. — V. 132. — P. 365–377.
375. Tamura K. Effect of Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein 7 on Steroidogenesis in Granulosa Cells Derived from Equine Chorionic Gonadotropin-Primed Immature Rat Ovaries / K. Tamura, M. Matsushita, A. Endo, M. Kutsukake, et al. // *Biol. Reprod.* — 2007. — V. 77. — P. 485–491.
376. Jaiswa R. Developmental Pattern of Small Antral Follicles in the Bovine Ovary / R. Jaiswa, J. Singh, G. Adams // *Biol. Reprod.* — 2004. — V. 71. — P. 1244–1251.
377. Ginther O. Selection of the Dominant Follicle in Cattle: Role of Two-Way Functional Coupling Between Follicle-Stimulating Hormone and the Follicles / O. Ginther, D. Bergfelt, L. Kulick, et al. // *Biol. Reprod.* — 2000. — V. 62. — P. 920–927.
378. Binellia M. Thatcher Persistent Dominant Follicle Alters Pattern of Oviductal Secretory Proteins from Cows at Estrus / M. Binellia, J. Hampton, W. Buhib // *Biol. Reprod.* — 1999. — V. 61. — P. 127–134.

ДОДАТКИ

Додаток А

ЗАТВЕРДЖУЮ

Голова СВК «Урожай», Луцького р-ну, Волинської області



Кулай Є.О.

2015р.

М.П.

ЗАТВЕРДЖУЮ

Заступник директора з наукової роботи Інституту біології тварин

НААН

д.б. н.

Іскра Р.Я.

“ ”

2015р.



А К Т
про виробничу перевірку

1. **Найменування науково-дослідної установи-розробника**
Інститут біології тварин НААН, лабораторія молекулярної біології та клінічної біохімії
(НДІ, дослідна станція, відділ, лабораторія та ін.)
2. **Найменування завершених робіт, поставлених на виробничу основу**
Ефективність застосування комплексного препарату «Фоліген»
3. **Автори завершених робіт** Остапів Д.Д., д.с.-г.н., Сачко Р.Г., к. с.-г.н., Боднар Ю.В., м.н.с.
(П. І. П., посада, звання)
4. **Завершені науково-дослідні роботи, рекомендовані до виробничої перевірки рішенням вченої ради**
(НДІ, дослідні станції та ін.)
5. **Виробнича перевірка проводилась у** СВК "Урожай", Луцького р-ну, Волинської області
(найменування господарства, підприємства, його відомче підпорядкування; місцезнаходження: область)
6. **Відповідальні за проведення виробничої перевірки** Остапів Д.Д., д.с.-г.н., Сачко Р.Г. к. с.-г.н., Боднар Ю В, м.н.с.
(П. І. П., установа, господарство, посада)
7. **Умови проведення перевірки** відповідали умовам утримання корів в зимово-стійловий період
(господарсько-економічні, що відповідають встановленим вимогам)
8. **Об'єм виробничої перевірки** 50 голів корів
(голів, тонн та ін.)
9. **Терміни проведення** 2015 р., лютий-травень
(рік, місяць, початок і закінчення в кожному окремому випадку)
10. **Методика виробничої перевірки** для виробничої перевірки було відібрано 50 корів чорно-рябої молочної породи, аналогів за віком і продуктивністю, які не приходять в охоту більше двох місяців після отелення. Тваринам дослідної групи (40 корів) внутрішньом'язово вводили препарат «Фоліген» у формі ліпосомальної емульсії у дозі 20 мл/голову. Повторне введення препарату проводили через 10 днів коровам, які не прийшли в охоту
(коротка характеристика прийнятого методу перевірки)

Продовження Додатку А

11.3 яким контролем проводилось порівняння закінчених досліджень
Тваринам контрольної групи (10 корів) вводили препарат «Естрофан» згідно
настанови по застосуванню.

12. Результати, що характеризують ефективність робіт, що перевіряють, у порівнянні з контролем:

а) основні господарські показники за результатами перевірки Після дворазового
введення препарату «Фоліген» 30 корів (75%) прийшли в охоту
 (якість продукції, зниження собівартості та ін.)

б) обґрунтований розрахунок економічного ефекту _____
 (ефект у гривнях на одиницю об'єму або на одиницю виробленої продукції)

13. Що рекомендується для освоєння у виробництві: З метою підвищення
відтворювальної функції корів, рекомендується вводити препарат «Фоліген»
дворазово з інтервалом 10 днів у дозі 20 мл/голову.

(коротка і чітка рекомендація виробництву)

14. Відповідальні виконавці виробничої перевірки:


а) від наукової установи

Остапів Д.Д., д.с.-г.н., Сачко Р.Г. к. с.-г.н., Боднар Ю В, м.н.с.

(П. І. П., посада, підпис)

б) від виробництва (господарства) гол. зоотехнік Синюк В.М., гол. вет. лікар
Боханюк В.Г.

(П. І. П., посада, підпис)


 Остапів Д.Д.
 Сачко Р.Г.
 Боднар Ю В,
 Синюк В.М.
 Боханюк В.Г.

Акт складений

“ 20 ” травня _____ 2015 р.

Додаток Б

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи та міжнародних
зв'язків Одеського державного
аграрного університету

доцент  Брошков М.М.

«23»  2015 р.

КАРТКА ЗВОТНОГО ЗВ'ЯЗКУ

Викладені в дисертаційній роботі "Активність окисних процесів та утворення гормонів клітинами гранульози яєчників корів" результати вивчення інтенсивності окисно-відновних процесів та здатності утворювати статеві гормони клітинами гранульозного шару фолікулів яєчників корів *in vitro* і отриманні сировини з гормональною активністю для виготовлення препарату зі стимулювання репродуктивної функції самок, прийняті для використання в навчальному процесі та наукових дослідженнях для розроблення ефективних способів відновлення репродуктивної функції самок корів.

Матеріали дисертаційної роботи здобувача Інституту біології тварин НААН Боднар Ю. В. розглянуто на засіданні кафедри фізіології, біохімії та мікробіології Одеського державного аграрного університету

Протокол № 2 від 16. 09. 2015 р.

Завідувач кафедри фізіології,
біохімії та мікробіології
к.б.н., доцент



Тихонов П.С.

Додаток В

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Перший проректор

Львівського національного

університету ветеринарної медицини та

біотехнологій імені С.З. Гжицького,

кандидат біологічних наук,

доктор філософії

Турко І. Б.

2015 р.



КАРТКА ЗВОРОТНОГО ЗВ'ЯЗКУ

Викладені в дисертаційній роботі "Активність окисних процесів та утворення гормонів клітинами гранульози яєчників корів" результати вивчення інтенсивності окисно-відновних процесів та здатності утворювати статеві гормони клітинами гранульозного шару фолікулів яєчників корів *in vitro* і отриманні сировини з гормональною активністю для виготовлення препарату зі стимулювання репродуктивної функції самок, прийняті для використання в навчальному процесі, наукових дослідженнях для розроблення ефективних способів відновлення репродуктивної функції самок сільськогосподарських тварин.

Матеріали дисертаційної роботи дисертантки Інституту біології тварин НААН Боднар Ю.В. розглянуто на засіданні кафедри акушерства, гінекології та біотехнології відтворення тварин імені Г. В. Зверєвої Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького.

Протокол № 2 від 23.09 2015 р.

Завідувач кафедри акушерства,
гінекології та біотехнології відтворення тварин
імені Г.В. Зверєвої
доктор ветеринарних наук, професор

В.Ю. Стефаник