

## АКТИВНІСТЬ І ВМІСТ ІЗОФОРМ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗИ ЗА КУЛЬТИВУВАННЯ КЛІТИН ГРАНУЛЬОЗИ

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

Інститут біології тварин НААН

*Вивчали активність та вміст ізоформ супероксиддисмутази (СОД) в клітинах гранульозного шару з фолікулів яєчників корів за тривалого культивування. Встановлено, що культура клітин гранульози характеризується активністю СОД —  $12,4 \pm 0,74$  МО/мг білка ( $8,1 \pm 2,29 - 18,2 \pm 4,72$  МО/мг білка). Активність СОД в культурі клітин гранульози забезпечують 5–6 ізоформ ензиму. Виявлено, що ізоформи за місцем локалізації в культурі клітин розділені на цитозольні, мітохондріальний й позаклітинний протеїни СОД. Цитозольна ізоформа представлена 3–4, а на мітохондріальну і позаклітинну припадає по одному активному протеїну ензиму. Активність ензиму й вміст ізоформ залежить від розміру фолікулів з яких вилучені клітини й фізіологічного стану яєчників. Досліджувані показники характеризують напруженість окисного метаболізму як в цілому в клітинах, так і в окремих їх частинах і органелах.*

Утворення активних форм кисню (АФК) в клітинах гранульозного шару фолікулів яєчників зумовлено окисним навантаженням, яке виникає *in vivo* при гіпоксичних явищах, порушенні мікроциркуляції і функцій клітин [1], а *in vitro* — різній концентрації кисню в атмосфері і тривалості культивування, використанні (окисненні) субстратів середовищ культивування та ресинтезі АТФ [2]. Для знищення АФК в гранульозі функціонує ефективна система антиоксидантного захисту (АОЗ), що складається з ензиматичної і неензиматичної ланок. Зокрема, одним із ензимів, який знешкоджує АФК є супероксиддисмутаза (СОД; ЕС 1.15.1.1). СОД перетворює супероксиданіон в реакції дисмутації на перекис водню і молекулярний кисень [3]. Вказаний ензим виявлений у фолікулах яєчників тварин і людини [4–7]. У фолікулах СОД захищає від  $O_2^{\cdot -}$  клітини гранульози та ооцити впродовж дозрівання [8]. При цьому, активність ензиму забезпечують три ізоформи, які за місцем локалізації у клітині розділяють на цитозольну (Cu-Zn-СОД; СОД1), мітохондріальну (Mn-СОД; СОД2) і позаклітинну (ES-СОД; СОД3) [7, 9]. Активність ензиму в фолікулах величина неоднозначна і залежить від стадії розвитку та розміру фолікулів [9].

*Мета досліджень — вивчити активність та вміст ізоформ супероксиддисмутази в клітинах гранульозного шару фолікулів яєчників за тривалого культивування.*

**Матеріали і методи.** Для досліджень підібрані клінічно здорові корови-аналоги української чорно-рябої молочної породи віком 4–8 років. Після забою корів відбирали яєчники різного фізіологічного стану [10]: фолікулярного зростання (без жовтого тіла); зі свіжою овуляцією (на місці фолікула є відтулина, жовте тіло відсутнє або червоного кольору, діаметром до 0,5 см); з раннім жовтим тілом (червоного або брунатного кольору, діаметром 1,0–2,0 см); з пізнім жовтим тілом (жовтого кольору, діаметром 0,5 – 1,5 см). Для досліджень використані статеві залози корів з фолікулами розміром до 4 мм (малі), 4–7 мм (середні) і понад 7 мм (великі). Для отримання клітин гранульози аспірували фолікули, антральну рідину центрифугували 10 хв при 2000 об/хв, супернатант відділяли, а осад клітин суспендували в середовищах культивування клітин: Basal Medium Eagle (BME) і RPMI-1640 з додаванням (в мас. %): еструсної сироватки корів 8–12 %; фолікулярної рідини — 10–12 %, гепарин (5 тис. од.) — 0,0005–0,0015). У культурі клітин визначали активність СОД — за кількістю нітроформазану (МО/мг білка) [11], ізоформи ензиму — фарбуванням пластин

гелю після електрофорезу в 10 % поліакриламідному гелі (ПААГ) [12, 13]. Статистичний аналіз отриманих результатів проведено за М. О. Плохінським [14].

**Результати й обговорення.** Встановлено, що клітини гранульозного шару характеризуються активністю СОД, яка становить  $12,4 \pm 0,74$  МО/мг білка. При цьому, активність ензиму гранульози залежить від фізіологічного стану яєчника. Зокрема, найвища активність СОД характерна для культури клітин з яєчника «свіжої овуляції» ( $18,3 \pm 4,22$  МО/ мг білка), майже така ж величина значення виявлена за «пізнього жовтого тіла» ( $16,8 \pm 4,15$  МО/ мг білка), нижча на 30,0–36,3 % за «фолікулярного росту», а найнижча ( $8,1 \pm 2,29$  МО/ мг білка) за «раннього жовтого тіла». Отже, низька активність СОД в культурі гранульози з фолікулів яєчника «раннього жовтого тіла» свідчить про понижену здатність клітин знищувати  $O_2^{\cdot-}$  й, відповідно, активування процесів вільнорадикального окиснення, руйнування структурних компонентів, зниження метаболічної активності при культивуванні.

Виявлено, що активність СОД гранульози забезпечують ізоформи ензиму (рис. 1).

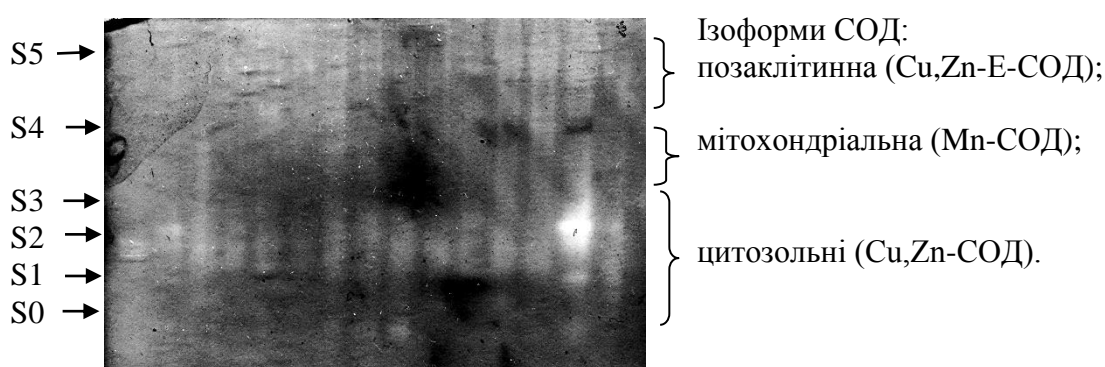


Рис. 1. Спектр ізоформ СОД культури клітин гранульози.

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 форми СОД представлена в основному трьома ізоформами ензиму S1, S2 і S3. Крім того, у культурі клітин гранульози, яка отримана з яєчника «фолікулярного росту» проявлялась додаткова, найбільш рухлива в електричному полі, ізоформа Cu-Zn-СОД – S0-ізоформа. В зоні рухливості мітохондріальної та позаклітинної СОД виявлено по одній смузі активних протеїнів ензиму, відповідно, S4 і S5.

Поряд з якісною відмінністю спектру ізоформ відрізняється й їх вміст. Зокрема, за культивування гранульози отриманих з фолікулів яєчника «свіжої овуляції» високий вміст S3-ізоформи СОД ( $29,3 \pm 7,06$  %) і понижений ( $6,7 \pm 0,72$  %) – S5 (позаклітинної; табл. 1).

Таблиця 1

**Вміст ізоформ СОД в культурі клітин гранульози залежно від фізіологічного стану яєчника (M ± m)**

Стан яєчників	n	Вміст ізоформ, %				
		Cu-Zn-СОД; СОД1			Mn-СОД	ES-СОД
		S1	S2	S3	S4	S5
Фолікулярний ріст	73	18,6±1,20**	19,9±1,24	19,7±1,29	31,3±1,59	10,5±0,69***
Пізнє жовте тіло	20	16,1±1,90	22,6±2,75*	15,7±1,70	32,0±2,76	13,6±1,74***
Раннє жовте тіло	3	13,7±1,10	13,3±3,41	15,7±1,78	44,7±5,36*	12,7±1,19**
Свіжа овуляція	3	15,7±2,40	18,7±7,66	29,3±7,06	29,7±7,09	6,7±0,72

Примітка: \* Різниця статистично вірогідна порівняно до мінімальної величини значення: \*p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\*p < 0,001

У культурі клітин з інших фізіологічних станів яєчників, порівняно зі «свіжою овуляцією», навпаки, вміст S3-ізоформи нижчий на 9,6 – 13,6 %, а S5 - вищий в 1,5 – 2 рази ( $p < 0,01 - 0,001$ ). Крім того, більш високим вмістом S1-ізоформи характеризувались клітини гранульози, отримані з яєчника «фолікулярного росту» ( $18,6 \pm 1,20$  %), меншим з «пізнього жовтого тіла» та «свіжої овуляції», відповідно, 15,7 і 16,1 %, а найнижчим ( $13,7 \pm 1,10$  %) з «раннього жовтого тіла». Різниця між мінімальною і максимальною величинами значення 4,9 % статистично вірогідна ( $p < 0,01$ ). Подібна відмінність встановлена за вмістом S2-ізоформи: високий ( $22,6 \pm 2,75$  %) у клітин з «пізнього жовтого тіла», нижчий на 2,7 – 3,9 % «фолікулярного росту» та «свіжої овуляції» і найменший ( $13,3 \pm 3,41$  %) за «раннього жовтого тіла». Різниця між вмістом S2-ізоформи культури клітин отриманої з яєчників «пізнього» і «раннього жовтого тіл» становить 9,3 % ( $p < 0,05$ ). Вміст мітохондріальної ізоформи СОД у культурі клітин з яєчника «раннього жовтого тіла» максимальний ( $44,7 \pm 5,36$  %) і на 12,7 – 15,0 % ( $p < 0,05$ ) нижчий у гранульозі з інших фізіологічних станів статевих залоз. Для гранульози яєчника «свіжої овуляції» характерний найнижчий вміст позаклітинної ізоформи ензиму ( $6,7 \pm 0,72$  %) і вищий на 3,8 – 6,9 % ( $p < 0,01 - 0,001$ ) для культури клітин отриманих з інших фізіологічних станів статевої залози.

Таким чином, для гранульози з яєчника «фолікулярного росту» за культивування характерний стабільно високий вміст Cu-Zn-СОД та ES-СОД і понижений Mn-СОД ізоформ; «пізнього жовтого тіла» — підвищений вміст S2-ізоформи Cu-Zn-СОД і Mn-СОД; «раннього жовтого тіла» — максимально високий вміст Mn-СОД і ES-СОД та понижений Cu-Zn-СОД; «свіжої овуляції» – високий вміст S3-ізоформи Cu-Zn-СОД та низький Mn-СОД і ES-СОД. Отримані результати свідчать про високу здатність культивованих клітин гранульози з яєчника «фолікулярного росту» захищати внутрішньоклітинні компоненти від  $O_2^{\cdot -}$  й ефективно їх перетворювати. При цьому, нагромадження супероксиданіону в мітохондріях низьке й, відповідно, понижений вміст мітохондріальної ізоформи СОД. У клітин гранульози з інших фізіологічних станів статевої залози за культивування активуються процеси утворення  $O_2^{\cdot -}$ : 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  $O_2^{\cdot -}$  зовнішньої мембрани клітин.

Активність СОД гранульози залежить не тільки від фізіологічного стану яєчника, але й від розміру фолікулів з яких вилучені клітини. Зокрема, у гранульозі з середнього розміру фолікулів яєчника «раннього жовтого тіла» за культивування активність ензиму низька ( $6,8 \pm 1,72$  МО/мг білка), вища на 20,5 % з малого і найвища ( $9,3 \pm 3,18$  МО/мг білка) з великого фолікулів (табл. 2).

Таблиця 2

**Активність СОД культури клітин гранульози залежно від розміру фолікулів та фізіологічного стану яєчника (M ± m)**

Розмір фолікула, мм	Активність СОД культури клітин з яєчників, МО/мг білка							
	Свіжа овуляція		Раннє жовте тіло		Пізнє жовте тіло		Фолікулярний ріст	
	n	M±m	n	M±m	n	M±m	n	M±m
> 7	3	17,8±5,48	5	9,3±3,18	9	18,9±3,99	33	12,2±1,47
4 - 7	3	17,0±4,95	3	6,8±1,72	6	17,5±4,99	29	11,1±1,38
4 <	3	19,8±3,75	3	8,2±1,96	7	14,1±3,47	31	11,4±1,24

Іншу залежність встановлено при дослідженні культури клітин із фолікулів яєчника «свіжої овуляції». Висока активність СОД характерна для гранульози з малих фолікулів ( $19,8 \pm 3,75$  МО/мг білка) і нижча на 10,2–14,2 % з середніх і великих фолікулів. У культурі клітин з «пізнього жовтого тіла» виявлено поступовий ріст активності ензиму зі збільшенням розміру фолікула: низька ( $14,1 \pm 3,47$  МО/мг білка) 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 клітин

гранульози з яєчника «фолікулярного росту» не залежить від величини фолікулів з яких вони вилучені – величина значення знаходиться в межах 11,1–12,2 МО/мг білка. Отже, для культивованої гранульози з фолікулів яєчника «фолікулярного росту», не залежно від розміру фолікулів з яких вони вилучені, характерна стабільна активність СОД. У клітин, вилучених з фолікулів яєчників «свіжої овуляції» і «пізнього жовтого тіла» проявляється тенденційно вища активність ензиму, що може вказувати на активування окисних процесів й інтенсивніше утворення  $O_2^{\cdot-}$  в процесі культивування. Клітини гранульози яєчника «раннього жовтого тіла» як в цілому, так і зокрема з середніх за розміром фолікулів, характеризуються найнижчою активністю СОД, що вказує на потенційно можливе нагромадження  $O_2^{\cdot-}$  і, як наслідок, порушення обмінних процесів та найбільшу їх уразливість при культивуванні.

Подібні відмінності виявлені при дослідженні вмісту ізоформ ензиму. Так, для культури клітин гранульози з фолікулів більше 7 мм, порівняно з меншими, яєчника «свіжої овуляції» характерний вищий на 6,0–11,0 % та 21,0–29,0 %, відповідно, вміст S1 і S3 нижчий на 24,0–31,0 та 25,0–27,0 % S2 і S4-ізоформ (рис. 2).

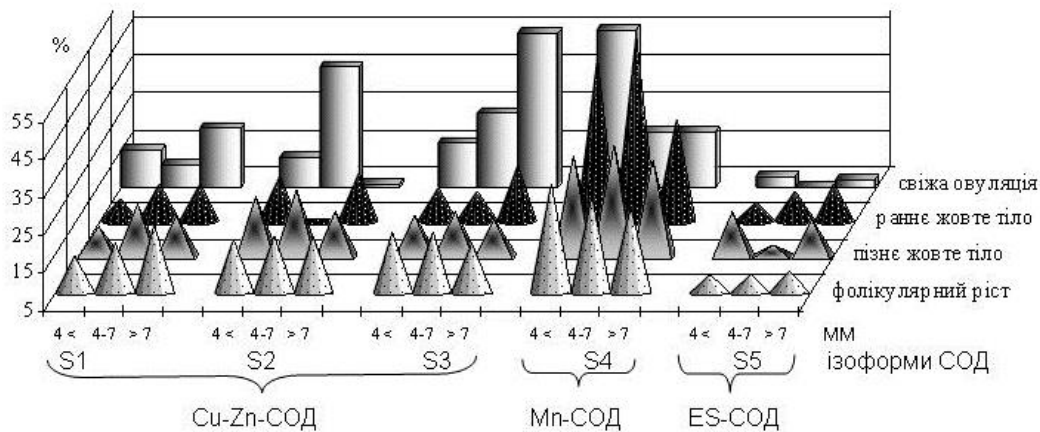


Рис. 2. Вміст ізоформ СОД в культурі клітин гранульози, залежно від фізіологічного стану яєчника і розміру фолікулів

У клітинах гранульози із середнього розміру фолікулів, порівняно з малими і великими, яєчника «раннього жовтого тіла» менший на 12,0–15,0 % вміст S2 і на 8,0–22,0 % більший S4-ізоформ. При цьому, вміст S3 і S5-ізоформ вищий, відповідно, на 6,0 – 7,0 % і 2,0 – 5,0 % у гранульозі з великих, порівняно з меншими фолікулами. Культура клітин не залежно від розміру фолікулів яєчника «пізнього жовтого тіла» характеризується майже однаковим вмістом ізоформ СОД: 13,5–18,8 % S1-, 21,0–23,4 % S2-, 14,8–17,4 % S3-, 30,6–35,0 % S4-ізоформи. Однак, вміст S5-ізоформи у культурі клітин з середнього фолікула, порівняно до аналогів з великого і малого, нижчий на 7,2–8,8 % ( $p < 0,05$ ). У гранульозі з яєчника «фолікулярного росту» зі збільшенням розміру від малого до великого фолікула при культивуванні пропорційно зростає вміст S1-ізоформи (на 7,5 %;  $p < 0,01$ ) та знижується на 6,1 % S4. Отже, за культивування гранульози з статевої залози «фолікулярного росту» в клітинах зростає окисне навантаження на цитозольні структури й проявляється тенденція до послаблення захисту мітохондрій від  $O_2^{\cdot-}$ . У культурі гранульози з середніх фолікулів яєчників «пізнього жовтого тіла» існує понижена здатність утилізувати супероксиданіон 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 на метаболічні процеси ще до вилучення клітин із фолікулів.

## В И С Н О В К И

1. Культура клітин гранулози характеризується активністю СОД –  $12,4 \pm 0,74$  МО/мг білка.

2. Активність СОД в культурі клітин гранулози забезпечують 5 – 6 ізоформ ензиму. Ізоформи за місцем локалізації в культурі клітин розділені на цитозольні, мітохондріальний й позаклітинний протеїни СОД. Цитозольна ізоформа представлена 3–4 активними протеїнами ензиму.

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

4. Активність і вміст ізоформ СОД характеризують напруженість окисного метаболізму як в цілому в клітинах, так і в окремих компартментах клітин.

**Перспективи подальших досліджень.** Дослідити залежність між активністю й вмістом ізоформ СОД та інтенсивністю синтезу гранулозою статевих гормонів.

## ACTIVITY AND ISOFORM CONTENT OF SUPEROXIDEDISMUTASE AT GRANULOSE CELL CULTIVATION

*Yu. V. Bodnar, N. V. Kuzmina, R. G. Sachko, D. D. Ostapiv*

Institute of Animal Biology of NAAS

## S U M M A R Y

Activity and isoform content of superoxidedismutase (SOD) in cow ovarian granulose layer cells at long cultivation term were studied. It is determined, that granulose cell culture characterizes by SOD activity —  $12,4 \pm 0,74$  IU/ mg of protein ( $8,1 \pm 2,29$  –  $18,2 \pm 4,72$  IU/ mg of protein). SOD activity in granulose cells is provided by 5–6 isoforms of enzyme. It is set, that isoforms by their localization in cell culture are divided on cytosolic, mitochondrial and extracellular SOD proteins. Cytosolic isoform is presented by 3–4 proteins, when mitochondrial and extracellular SOD have only one active protein of enzyme. Activity of enzyme and isoform content depends on follicle size, form which cells are extirpated and from physiological state of ovaries. Studied indexes characterize oxidative metabolism tension in cells in general, in its parts and organelles.

## АКТИВНОСТЬ И СОДЕРЖАНИЕ ИЗОФОРМ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ КЛЕТОК ГРАНУЛЕЗЫ

*Ю. В. Боднар, Н. В. Кузьмина, Р. Г. Сачко, Д. Д. Остапив*

Институт биологии животных НААН

## А Н Н О Т А Ц И Я

Изучали активность и содержание изоформ супероксиддисмутазы (СОД) в клетках гранулезного слоя из фолликулов яичников коров при продолжительном культивировании. Установлено, что культура клеток гранулезы характеризуется активностью СОД —  $12,4 \pm 0,74$  МО/мг белка ( $8,1 \pm 2,29$  –  $18,2 \pm 4,72$  МО/мг белка). Активность СОД в культуре клеток

гранулезы обеспечивают 5–6 изоформ энзима. Выявлено, что изоформы в зависимости от места локализации в культуре клеток разделены на цитозольные, митохондриальный и внеклеточный протеины СОД. Цитозольная изоформа представлена 3–4, а на митохондриальную и внеклеточную приходится по одному активному протеину энзима. Активность энзима и содержание изоформ зависит от размера фолликул, из которых получены клетки и физиологического состояния яичников. Исследуемые показатели характеризуют напряженность окислительного метаболизма как в целом в клетках, так и в отдельных их компартментах.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. *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 // *Fertil. Steril.* — 1997. — Vol. 68. — P. 60–612.
2. *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. // *Animal Reproduction Science.* — 2010. — Vol. 117. — P. 83–89.
3. *Yu B. P.* Cellular defenses against damage from reactive oxygen species / B. P. Yu // *Physiol. Rev.* — 1994. — Vol. 74. — P. 139–162.
4. *Ho Y-S.* Reduced fertility in female mice lacking copper-zinc superoxide dismutase / Y-S. Ho, M. Gargano, R. T. Bronson et al. // *Biol. Chem.* — 1998. — Vol. 273. — P. 7765–7769.
5. *Matzuk M. M.* Ovarian function in superoxide dismutase 1 and 2 knockout mice / M. M. Matzuk, L. Dionne, Q. Guo et al. // *Endocrinology.* — 1998. — Vol. 139. — P. 4008–4011.
6. *Wong P. C.* Copper chaperone for superoxide dismutase is essential to activate mammalian cu/zn superoxide dismutase / P. C. Wong, D. Waggoner, J. R. Subramaniam et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* — 2000. — Vol. 97. — P. 2886–2891.
7. *Holick E.* Profiling of the superoxide dismutase antioxidants in bovine follicular fluids from developing antral follicles / E. Holick, P. Louis, S. Czerniak et al. // *Biology of Reproduction.* — 2007. — Vol. 77. — P. 114.
8. *Patrick J.* Roles of Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Ovarian Toxicity / J. Patrick, Devine, S. D. Perreault, U. Luderer // *Biol. Reprod.* — 2012. — Vol. 86, № 2. — P. 27.
9. *Catherine M. H.* Profiling of superoxide dismutase isoenzymes in compartments of the developing bovine antral follicles / M. H. Catherine, A. E. Holick, J. L. Paoletta et al. // *Reproduction.* — 2010. — Vol. 139. — P. 871–881.
10. *Гузеватий О. Є.* Оцінка функціонального стану ооцит-кумуляційних комплексів корів залежно від типу яєчника / О. Є. Гузеватий, В. В. Ясінський, Л. В. Смукла та ін. // *Вісник аграрної науки.* — 1995. — № 11. — С. 94–98.
11. *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.
12. *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.
13. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині: довідник / [Влізло В. В., Федорук Р. С., Ратич І. Б., ... Кузьміна Н. В. та ін.]; за ред. В. В. Влізло — Львів: Сполом, — 2012. — 764 с.
14. *Плохинский Н. А.* Биометрия / Н. А. Плохинский // М.: МГУ. — 1970. — С. 53–60.

