УДК: 661. 185.1: 599.323.4:612.35: 57.015.2

АКТИВНІСТЬ І ВМІСТ ІЗОЗИМІВ ГЛУТАТІОНПЕРОКСИДАЗИ КЛІТИН ГРАНУЛЬОЗНОГО ШАРУ ЯЄЧНИКІВ КОРІВ ЗА КУЛЬТИВУВАННЯ

Ю. В. Боднар[1], *мол. наук. співробітник*

Інститут біології тварин НААН
вул. В. Стуса, 38, м. Львів, 79034, Україна

Досліджували активність і вміст ізозимів глутатіонпероксидази культури клітин гранульозного шару фолікулів, залежно від фізіологічного стану яєчників корів. Встановлено, що для культури клітин гранульозного шару фолікулів яєчників корів характерна активність ГПО — 0,61±0,06 мкмоль/хв×мг білка. Низька активність ГПО проявляється у клітин гранульози із фолікулів яєчника фізіологічного стану «раннього жовтого тіла» (0,09±001 мкмоль/хв×мг білка), а висока (0,63–0,88 мкмоль/хв×мг білка) — при «фолікулярному рості» та «пізньому жовтому тілі». Електрофорезом в 7,5% ПААГ у культурі клітин гранульози виявлено 5–6 активних протеїнів ГПО, які проявляються безбарвними смугами і характеризуються різною рухливістю в електричному полі та площею. Вміст ізозимів ГПО — площа смуг протеїнів, залежать від фізіологічного стану яєчників, з яких вилучені клітини гранульози. Встановлено, що клітини гранульози з яєчника «свіжої овуляції», культивовані in vitro, мають понижену здатність до перетворення H_2O_2, захист від пероксидів ліпідів та гідропероксидів фосфоліпідів і окиснення білків, мітохондріальних і клітинних мембран, схильність до апоптозу. Про вказані особливості культури клітин із фолікулів яєчника «свіжої овуляції» свідчать низький вміст ГПО1(14,7±2,93%) та ГПО4 (11,2±3,80%). Для гранульози із фолікулів яєчників фізіологічних станів «пізнього жовтого тіла» і «фолікулярного росту» характерний помірний вміст ізозимів ГПО, що вказує на захищеність структур клітин від окисного навантаження за культивування.

Ключові слова: ГЛУТАТІОНПЕРОКСИДАЗА, ІЗОЗИМИ, КЛІТИНИ ГРАНУЛЬОЗИ, ЯЄЧНИКИ КОРІВ.

Глутатіонпероксидаза (ГПО) (КФ 1.11.1.9; ГПО, GPX) — ензим, що каталізує реакцію відновлення пероксиду Гідрогену до води і молекулярного кисню та відіграє центральну роль у знищенні пероксидів із використанням відновленої форми глутатіону (ГSH) в якості донора електронів [1]. ГПО здійснює регулювання низьких, фізіологічних, концентрацій H_2O_2 у внутрішньоклітинних та позаклітинних компартментах і здатний відновлювати, 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 активних форм кисню (АФО) [2].

До родини протеїнів з активністю ГSH-пероксидаз відносяться багато ензимів. У ссавців розрізняють декілька генетично зумовлених ізозимів ензиму, що є гомотетрамерними чи мономерними протеїнами, для яких характерна тканинна специфічність. Зокрема, ГПО1 — ізозим, який поширений у тканинах організму та бере участь у знищенні пероксидів ліпідів і захисті білків від окиснення, залежить від селену, контролює метаболізм лейкотрієнів; ГПО2 — руйнує гідроперекиси ліпідів; ГПО3 — виявляється в плазмі і позаклітинній рідині, захищає мембрани клітин від окиснення, перетворює гідропероксиди

[1]Науковий керівник – Д. Д. Остапів, д. с.-г. н.

фосфоліпідів; ГПО4 — локалізований в мітохондріях і цитозолі й знищує гідропероксиди фосфоліпідів та діє синергічно з вітаміном Е, захищаючи мембрани від пероксидного ушкодження, гальмує апоптоз; ГПО5 — позаклітинний ізозим, який регулює вміст відновленої форми Г-SH в екстрацелюлярному просторі [3]. Активність ензиму виявлена у фолікулах яєчників [4, 5], а клітини фолікулів яєчників, в тому числі й гранульозного шару, експресують ізозими ГПО, від вмісту яких залежить дозрівання і запліднення ооцитів та розвиток ембріонів [6].

Мета досліджень — вивчити активність і вміст ізозимів глутатіонпероксидази в культурі клітин гранульозного шару фолікулів яєчників корів, залежно від фізіологічного стану статевих залоз.

Матеріали і методи. Для досліджень були підібрані клінічно здорові корови-аналоги української чорно-рябої молочної породи віком 4–8 років. Після забою корів, відбирали яєчники фізіологічного стану: фолікулярного зростання (без жовтого тіла); зі свіжою овуляцією (на місці фолікула є відтулина, жовте тіло відсутнє або червоного кольору, діаметром до 0,5 см); з раннім жовтим тілом (червоного або брунатного кольору, діаметром 1,0–2,0 см); з пізнім жовтим тілом (жовтого кольору, діаметром 0,5–1,5 см) [7].

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%), гепарину (0,001 од/100мл), інсуліну (4 мкг/мл).

Активність ГПО (мкмоль Г-SH / хв×мг протеїну) визначали з використанням реактиву Елмана [8]. Для виявлення протеїнів ГПО проводили електрофорез у 7,5% поліакриламідному гелі (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 ГПО пластини гелю інкубували у суміші з 50 мМ Трис-HCl буфері (pH 7,9), 3 мМ відновленого глутатіону, 0,004% H_2O_2, 1,2 мМ НСТ і 1,6 мМ ФМС протягом 45 хв. Незафарбовані смуги ензиму проявлялися на фіолетово-синьому фоні [9]. Ізозими ГПО ідентифікували за електрофоретичною рухливістю в ПААГ [10]. Статистичний аналіз отриманих результатів проведено методом варіаційної статистики за М. О. Плохінським [11] з використанням персонального комп’ютера.

Результати й обговорення. Активність ГПО в культурі клітин гранульози становить 0,61±0,06 мкмоль/хв×мг білка. Величина значення показника в гранульозі не постійна і залежать від фізіологічного стану яєчників з фолікулів яких вона отримана. Зокрема, активність ГПО низька у клітинах, які вилучені з фолікулів яєчника фізіологічного стану «раннього жовтого тіла» (0,09±001 мкмоль/хв×мг білка), на 64,0% вища в культурі гранульози зі статевої залози «свіжої овуляції» і ще на 86,0–89,7% ($p < 0,001$) більша при «фолікулярному рості» та «пізньому жовтому тілі». Отже, низька активність ГПО в культурі гранульози з фолікулів яєчника «раннього жовтого тіла» свідчить про понижену здатність клітин перетворювати H_2O_2 до кінцевого продукту — води й можливого активування вільнорадикального окиснення, зростання продуктів перекисного окиснення ліпідів, руйнування структурних компонентів, зниження метаболічної активності при культивуванні та виживання клітин. Висока активність ензиму в клітинах, отриманих з фолікулів яєчників «фолікулярного росту» та «пізнього жовтого тіла», вказує на фізіологічно необхідний рівень захищеності клітин при існуванні.

При вивченні нативних протеїнів ГПО культури клітин електрофорезом в ПААГ виявлено, що активність ензиму забезпечується 5–6 активними протеїнами, які проявляються безбарвними смугами, різної рухливості в електричному полі та площі (рис.). При цьому

площа смуг ізозимів й, відповідно, відносний їх вміст, залежить від фізіологічного стану яєчників, з яких вилучені клітини гранульози.

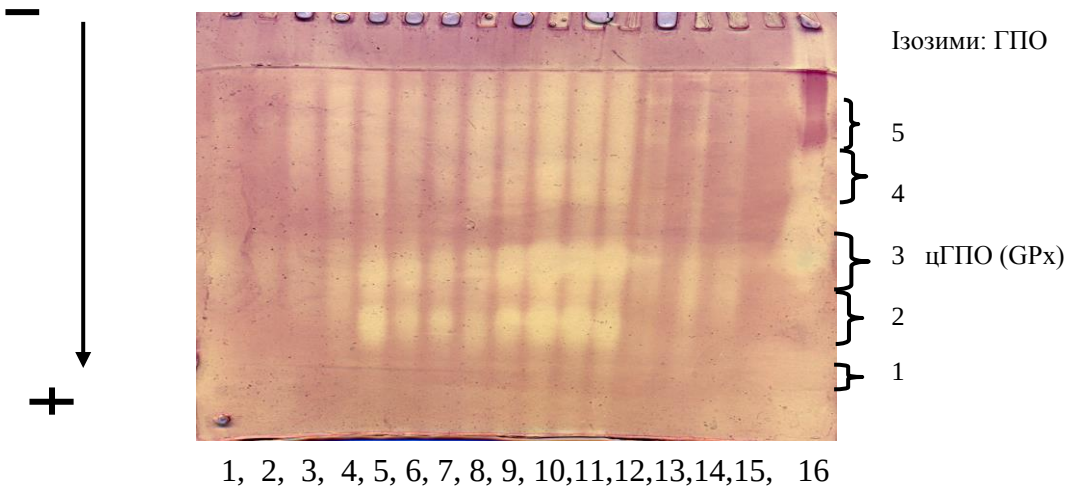

Рис. Ізозими ГПО культури клітин гранульози з фолікулів яєчників корів: 1-15 клітини гранульози, 16 – еритроцити крові корови

Зокрема, найвищим вмістом ГПО1 характеризуються клітини з яєчників «фолікулярного росту» (24,2±2,13%), нижчими на 4,7–5,9% з «пізнього» і «раннього жовтого тіла» і найменшим (14,7±2,93%) зі «свіжої овуляції» (табл.).

Таблиця

Вміст ізозимів ГПО в культурі клітин гранульози залежно від фізіологічного стану яєчника, M ± 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	19,7±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	16,4±4,30	19,5±1,90
ГПО 2	21,5±3,73	31,3±5,88	23,3±5,77	25,9±2,64
ГПО 1	14,7±2,93**	19,5±4,92	18,3±3,07	24,2±2,13

Примітка: різниця статистично вірогідна порівняно з максимальною величиною показника **p < 0,01.

Різниця між мінімальним і максимальним значеннями становить 9,5% і статистично вірогідна (p < 0,01). Отже, в культури клітин з фолікулів яєчника фізіологічного стану «свіжої овуляції» знищення пероксидів ліпідів та захист білків від окиснення понижене, що може характеризувати низьку здатність гранульози виживати за умов in vitro.

Вміст ГПО2 високий у культурі гранульози з яєчника «раннього жовтого тіла» (31,3±5,88%), майже однаковий з «пізнього жовтого тіла» і «фолікулярного росту» (23,3–25,9%) та найнижчий зі «свіжої овуляції» (21,5±3,73%). Різниця між мінімальним і максимальним значеннями становить 9,8% (p > 0,05).

Культура клітин гранульози, яка отримана з яєчника «пізнього жовтого тіла» проявляє найнижчий вміст ГПО3 (16,4±4,30%), а найвищий (29,8±10,20%) зі «свіжої овуляції» і майже однаковий (19,5–21,9%) з «раннього жовтого тіла» і «фолікулярного росту». Різниця між мінімальним і максимальним значеннями становить 13,4% (p > 0,05).

У культурі 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 проявляються у гранульозі з яєчника «пізнього жовтого тіла» і «свіжої овуляції» (19,7–22,7%), а менші на 3,9–5,9% з яєчників «раннього жовтого тіла» і «фолікулярного росту».

Таким чином, клітини гранульози з яєчника «свіжої овуляції», культивовані in vitro, мають понижені: здатність до перетворення H_2O_2, захист від пероксидів ліпідів та гідропероксидів фосфоліпідів і окиснення білків, мітохондріальних і клітинних мембран, схильність до апоптозу. І навпаки, гранульоза з фолікулів яєчників фізіологічних станів «фолікулярного росту» та «пізнього жовтого тіла» здатна захищати структурні елементи клітин від зростаючого окисного навантаження за культивування.

В И С Н О В К И

1. Для культури клітин гранульозного шару фолікулів яєчників корів характерна активність ГПО — 0,61±0,06 мкмоль/хв×мг білка.
2. Низька активність ГПО проявляється у клітин гранульози з фолікулів яєчника фізіологічного стану «раннього жовтого тіла» (0,09±001 мкмоль/хв×мг білка), а висока (0,63–0,88 мкмоль/хв×мг білка) — при «фолікулярному рості» та «пізньому жовтому тілі».
3. У культурі клітин гранульози виявлено 5–6 активних протеїнів ГПО, які проявляються безбарвними смугами в ПААГ і характеризуються різною рухливістю в електричному полі та площею.
4. Площа смуг протеїнів ензиму і, відповідно, вміст ізозимів залежать від фізіологічного стану яєчників з фолікулів яких вилучені клітини гранульози.
5. Клітини гранульози з яєчника «свіжої овуляції», культивовані in vitro, мають понижену здатність до перетворення H_2O_2, захист від пероксидів ліпідів та гідропероксидів фосфоліпідів і окиснення білків, мітохондріальних і клітинних мембран, схильність до апоптозу.
6. Для гранульози з фолікулів яєчників фізіологічних станів «пізнього жовтого тіла» і «фолікулярного росту» характерні помірні величини вмісту ізозимів ГПО, що може свідчити про захищеність структур клітин від окисного навантаження за культивування.

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

GLUTATHIONE PEROXIDASE ACTIVITY AND IZOZYME CONTENT OF COW OVARIAN GRANULOSE CELL LAYER AT CULTIVATION

Yu. V. Bodnar

Institute of Animal Biology of NAAS
38, V. Stusa str., Lviv, 79034, Ukraine

S U M M A R Y

Activity and isozyme content of glutathione peroxidase (GPx) of cow follicle granulose cell layer in dependence from ovarian physiological state were studied. It was determined, that granulose cell culture of cow ovaries characterizes by GPx activity – 0,61±0,06 µmol GSH/min×mg of protein. Low GPx activity manifests in granulose cells from ovarian follicles “early corpora lutea” (0,09±001 µmol GSH/min×mg of protein), and high (0,63–0,88 µmol GSH/min×mg of

protein) at “follicle growth” and “late corpora lutea”. By electrophoresis in 7,5% PAAG in granulose cell culture was determined 5–6 active proteins of GPx, that are showed by colorless bands and characterize by different mobility in electric field and area. GPx isozyme content – band areas depend on physiological state of ovaries from which cells were taken. It was determined, that granulose cells from ovary at “fresh ovulation” state, cultivated in vitro, have low ability to transform H_2O_2 – protection from lipid peroxides and phospholipid hydroperoxides and protein oxidation, mitochondrial and cell membranes, apoptosis predisposition. In favor of this witness low content of GPx1 (14,7±2,93%) and GPx4 (11,2±3,80%). Granulose cells from “follicle growth” and “late corpora lutea” states characterizes by medium content of GPx isozymes, that points out protected cell structures from oxidative load at cultivation.

Keywords: GLUTATHIONE PEROXIDASE, ISOZYME, GRANULOSE CELLS, OVARIES, COWS.

АКТИВНОСТЬ И СОДЕРЖАНИЕ ИЗОЗИМОВ ГЛУТАТИОНПЕРОКСИДАЗЫ КЛЕТОК ГРАНУЛЕЗНОГО СЛОЯ ЯИЧНИКОВ КОРОВ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ

Ю. В. Боднар

Институт биологии животных НААН
ул. В. Стуса, 38, г. Львов, 79034, Украина

А Н Н О Т А Ц И Я

Исследовали активность и содержание изозимов глутатионпероксидазы культуры клеток гранулезного слоя фолликулов в зависимости от физиологического состояния яичников коров. Установлено, что для культуры клеток гранулезного слоя фолликулов яичников коров характерна активность ГПО - 0,61 ± 0,06 мкмоль / мин × мг белка. Низкая активность ГПО проявляется у клеток гранулезы из фолликулов яичника физиологического состояния «раннего желтого тела» (0,09 ± 0,01 мкмоль / мин × мг белка), а высокая (0,63 - 0,88 мкмоль / мин × мг белка) при «фолликулярном росте» и «позднем желтом теле». Электрофорезом в 7,5% ПААГ в культуре клеток гранулезы выявлено 5–6 активных протеинов ГПО, которые проявляются бесцветными полосами и характеризуются разной подвижностью в электрическом поле, площадью и интенсивностью окраски. Содержание изозимов ГПО - площадь полос протеинов, зависят от физиологического состояния яичников из которых получены клетки гранулезы. Установлено, что клетки гранулезы из яичника «свежей овуляции», культивируемые in vitro, имеют пониженную способность к превращению H_2O_2, защите от пероксидов липидов и гидропероксидов фосфолипидов, окисления белков, митохондриальных и клеточных мембран, склонностью к апоптозу. О указанных особенностях культуры клеток из фолликулов яичника «свежей овуляции» свидетельствуют пониженное содержание ГПО1 (14,7 ± 2,93%) и ГПО4 (11,2 ± 3,80%). Для гранулезы из фолликулов яичников физиологического состояния «позднего жёлтого тела» и «фолликулярного роста» характерно умеренное содержание изозимов ГПО, что свидетельствует о защищенности структур клеток от окислительной нагрузки при культивировании.

Ключевые слова: ГЛУТАТИОНПЕРОКСИДАЗА, ИЗОЗИМЫ, КЛЕТКИ ГРАНУЛЕЗЫ, ЯИЧНИКИ КОРОВ.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. *Reed D. J.* Chemical mechanisms of drug-induced liver injury. Hepatology: A Textbook of Liver Disease / Reed D. J. — Philadelphia: WB Saunders Company. — 1990. — P. 737–753.

2. *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.

3. *Arthur J. R.* The glutathione peroxidases. / J. R. Arthur // Cell. Mol. Life Sci. — 2000. — Vol. 57. — P. 1825–1835.

4. *Carbone M. C.* Antioxidant enzymatic defences in human follicular fluid: characterization and age-dependent changes / M. C. Carbone, C. Tatone, S. Delle Monache et al. // Molecular Human Reproduction. — 2003. — Vol. 9. — P. 639–643.

5. *Valdez K. E.* Regulation of apoptosis in the atresia of dominant bovine follicles of the first follicular wave following ovulation / K. E. Valdez, S. P. Cuneo, A. M. Turzillo // Reproduction. — 2005. — Vol. 130. — P. 71–81.

6. *Brigelius-Flohe R.* Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. / R. Brigelius-Flohe. // Free Radic. Biol. Med. — 1999. — Vol. 27. — P. 951–965.

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

8. *Моим В. М.* Простой и специфический метод определения глутатионпероксидазы в эритроцитах // Лаб. дело. — 1986. — № 12. — С. 724–727.

9. *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. — Vol. 23. — P. 513–516.

10. *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. — Vol. 5. — № 1. — P. 51–66.

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

Рецензент — О. Г. Малик, д. вет. н., Інститут біології тварин НААН.