

АКТИВНІСТЬ І ВМІСТ ІЗОЗИМІВ МАЛАТДЕГІДРОГЕНАЗИ У ТКАНИНАХ ЯЄЧНИКІВ І МАТКИ КОРІВ ВПРОДОВЖ СТАТЕВОГО ЦИКЛУ

М. М. Акимішин
marjasha_ua@ukr.net

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

Досліджували активність і вміст ізозимів малатдегідрогенази (МДГ) у тканинах яєчників й ендометрію та антральній рідині фолікулів на різних стадіях фолікуло- і лютеогенезу та за гіпофункції гонад.

Встановлено, що активність МДГ у тканині яєчника висока у фолікулярній фазі ($1,0 \pm 0,21$ нмоль/хв \times мг білка), на 20,0 % нижча за раннього жовтого тіла і найнижча за пізнього жовтого тіла ($0,6 \pm 0,16$ нмоль/хв \times мг білка). У слизовій матки за активних яєчників величина значення перебуває в межах 0,9–1,3 нмоль/хв \times мг білка і на 55,6–69,3 % нижча за гіпофункції. В антральній рідині фолікулів залежно від фізіологічних станів яєчника встановлено, що активність МДГ висока ($1,6 \pm 0,46$ нмоль/хв \times мг білка) з фолікулів розмірами до 4 мм за фолікулярного росту, з 4–7 мм ($0,6–0,7$ нмоль/хв \times мг білка) за пізнього і раннього жовтого тіла і найнижча ($0,4 \pm 0,06$ нмоль/хв \times мг білка) за гіпофункції. У тканинах репродуктивних органів і антральній рідині з фолікулів яєчників корів виявлено три смуги активних протеїнів МДГ, з яких за електрофоретичною рухливістю дві відповідають цитозольним ізозимам (МДГ1 і МДГ2) і одна — мітохондріальному (МДГ3). Встановлено, що у тканині яєчника високий вміст МДГ1 та МДГ2 (33,7–44,9 %) і низький — МДГ3 (18,8–27,1 %), в ендометрії основна частина вмісту припадає на МДГ2 (36,0–56,7 %) і менша — на МДГ1 (26,5–35,2 %) та МДГ3 (16,7–29,0 %). В антральній рідині з фолікулів статевих залоз найвищий вміст МДГ1 з яєчника за раннього жовтого тіла (52,5–60,9 %), МДГ2 — за пізнього жовтого тіла (43,9–56,1 %), а МДГ3 — за фолікулярного росту (27,7–41,8 %). Аналізом кореляцій встановлено, що активність МДГ від зміни фізіологічного стану і за гіпофункції яєчника у тканині статевої залози проявляє залежність середньої сили ($\eta=0,353$), в ендометрії — сильну ($\eta=0,799$). Вміст МДГ3 у тканині статевої залози і МДГ2 в ендометрії зі зміною фізіологічного стану та за гіпофункції яєчників корелює з середньою силою (відповідно, $\eta=0,509$ і $0,325$). Кореляційне відношення за розміром фолікулів яєчника раннього жовтого тіла для вмісту МДГ2 в антральній рідині криволінійне середньої сили ($\eta=0,382$).

Ключові слова: МАЛАТДЕГІДРОГЕНАЗА, АКТИВНІСТЬ, ІЗОЗИМИ, КОРОВИ, ЕНДОМЕТРІЙ, ЯЄЧНИКИ, ФОЛІКУЛОГЕНЕЗ, ЛЮТЕОГЕНЕЗ

MALATE DEHYDROGENASE ACTIVITY AND ISOZYME CONTENT IN UTERUS AND OVARIAN TISSUES OF COWS DURING ESTRAL CYCLE

М. М. Акимішин
marjasha_ua@ukr.net

Institute of animal biology NAAS,
38 V. Stusa str., Lviv 79034, Ukraine

Malate dehydrogenase (MDG) activity and isozyme content in ovarian tissues, follicle antral fluid and endometrium on different stages of folliculogenesis and luteogenesis, and at hypofunction were studied.

It is registered that MDG activity in ovarian tissues is the highest in follicle phase (1.0 ± 0.21 nmol/min \times mg of protein), it is lower on 20 % when ovary is in early corpus luteum state and the lowest at state of late corpus luteum (0.6 ± 0.16 nmol/min \times mg of protein). In endometrium in active ovarian phase activity of MDG is 0.9–1.3 nmol/min \times mg of protein and indexes are on 55.6–69.3 % lower when hypofunction is present. In follicle antral fluid depending on physiological state of ovary activity of MDG is different. In follicles with size less than 4 mm the MDG activity is high (1.6 ± 0.46 nmol/min \times mg of protein) at state of follicle growth with size 4–7 mm is lower at states of early and late corpus luteum ($0.6–0.7$ nmol/min \times mg of protein) and it is the lowest (0.4 ± 0.06 nmol/min \times mg of protein) when hypofunction is present. In tissues of gonads and antral fluid from ovarian follicles we registered three active MDG proteins, that correspond by electroforetical mobility to two cytosol isozymes (MDG1 and MDG2) and one mitochondrial (MDG3). In ovarian tissue MDG1 and MDG2 content is high (33.7–44.9 %) and MDG3 content is low (18.8–27.1 %), and in endometrium the main part of enzyme falls on MDG2 (36.0–56.7 %) and less — on MDG1 (26.5–35.2 %) and

MDG3 (16.7–29.0 %). In antral fluid from follicles content of MDG1 in state of early corpus luteum is the highest (52.5–60.9 %), content of MDG2 is the highest at state of late corpus luteum (43.9–56.1 %), and MDG3 — in follicle growth (27.7–41.8 %). Correlation analysis showed that MDG activity in connection with physiological state change and when hypofunction is present has medium strength ($\eta=0.353$), and in endometrium is strong ($\eta=0.799$). Content of MDG3 in gonad tissue and MDG2 in endometrium with change of physiological state and when hypofunction is present correlates with medium force ($\eta=0.509$ i 0.325 , correspondingly). Correlation ratio between size of follicle at early corpus luteum state and activity of MDG2 in antral fluid is curvilinear and has medium strength ($\eta=0.382$).

Keywords: MALATE DEHYDROGENASE, ACTIVITY, ISOZYMES, ENDOMETRIUM, OVARIES, FOLLICULOGENESIS, LUTEOGENESIS, COWS

АКТИВНОСТЬ И СОДЕРЖАНИЕ ИЗОЗИМОВ МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ТКАНЯХ ЯИЧНИКОВ И МАТКИ КОРОВ НА ПРОТЯЖЕНИИ ПОЛОВОГО ЦИКЛА

М. М. Акмышин
marjasha_ua@ukr.net

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

Исследовали активность и содержание изозимов малатдегидрогеназы (МДГ) в тканях яичника, эндометрия и антральной жидкости фолликулов на разных стадиях фолликуло- и лютеогенеза и при гипофункции гонад.

Установлено, что активность МДГ в ткани яичника высокая в фолликулярной фазе ($1,0 \pm 0,21$ нмоль/мин \times мг белка), на 20,0 % ниже при раннем жёлтом теле и самая низкая при позднем жёлтом теле ($0,6 \pm 0,16$ нмоль/мин \times мг белка). В слизистой матки при активных яичниках величина значения находится в границах 0,9–1,3 нмоль/мин \times мг белка и на 55,6–69,3 % ниже при гипофункции. В антральной жидкости фолликулов в зависимости от физиологических состояний яичника установлено, что активность МДГ высокая ($1,6 \pm 0,46$ нмоль/мин \times мг белка) с фолликулов меньше 4 мм при фолликулярном росте, с 4–7 мм ($0,6–0,7$ нмоль/мин \times мг белка) при позднем и раннем жёлтом теле и самая низкая ($0,4 \pm 0,06$ нмоль/мин \times мг белка) при гипофункции. В тканях репродуктивных органов и антральной жидкости с фолликулов яичников коров выявлено три полосы активных протеинов МДГ, которые при электрофоретической подвижности соответствуют изозимам: две — цитозольным (МДГ1 и МДГ2) и одна — митохондриальному (МДГ3). Установлено, что в ткани яичника содержание МДГ1 и МДГ2 высокое (33,7–44,9 %) и низкое МДГ3 (18,8–27,1 %), в эндометрии — основная часть содержания приходится на МДГ2 (36,0–56,7 %) и меньше на МДГ1 (26,5–35,2 %) и МДГ3 (16,7–29,0 %) в антральной жидкости с фолликулов половых желёз наивысшее содержание МДГ1 с яичника раннего жёлтого тела (52,5–60,9 %), МДГ2 — с позднего жёлтого тела (43,9–56,1 %), а МДГ3 — с фолликулярного роста (27,7–41,8 %). Анализом корреляций установлено, что активность МДГ от изменения физиологического состояния и при гипофункции яичника в ткани половой железы проявляет зависимость средней силы ($\eta=0,353$), в эндометрии — сильную ($\eta=0,799$). Содержание МДГ3 в ткани половой железы и МДГ2 в эндометрии с изменением физиологического состояния и при гипофункции яичников коррелирует со средней силой (соответственно, $\eta=0,509$ i $0,325$). Корреляционное отношение за размером фолликулов яичника и раннего жёлтого тела для содержания МДГ2 в антральной жидкости криволинейное средней силы ($\eta=0,382$).

Ключевые слова: МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗА, АКТИВНОСТЬ, ИЗОЗИМЫ, КОРОВЫ, ЭНДОМЕТРИЙ, ЯИЧНИКИ, ФОЛЛИКУЛОГЕНЕЗ, ЛЮТЕОГЕНЕЗ

Малатдегидрогеназа (МДГ, ЕС 1.1.1.37) — фермент, який каталізує перетворення оксалоацетату і малату за участі коферментів НАД⁺ / НАДН [10, 2]. Фермент бере участь у багатьох метаболічних процесах, зокрема у циклі трикарбонних кислот, синтезі амінокислот, глюконеогенезі, сприяє обміну метаболітів між цитоплазмою і органелами.

Малатдегидрогеназа — це мультимерний фермент (димер або тетрамер), що подубований з ідентичних субодиниць молекулярною масою 30–35 кДа. У клітині виявляють в основному дві ізоформи ферменту: одна — фермент циклу трикарбонних кислот мітохондрій, інша виявлена в цитозолі, де бере участь у малат-аспаратному шунті. Зокрема, цитозольна МДГ

(МДГ1) є гомодимером, кожна субодиниця якого має молекулярну масу 35 кДа і містить 332 амінокислотні залишки, а мітохондріальна МДГ (МДГ2) — димер, сформований з ідентичних субодиниць з молекулярною масою 34 кДа, який містить послідовність з 314 залишків амінокислот. Ізозими кодуються генами ядра, синтезуються на цитоплазматичних рибосомах та імпортуються в органели. Всі МДГ є НАД-залежними, крім ензиму хлоропластів, який використовує НАДФ як кофермент. Крім того, дослідженнями, проведеними на верблюдах та свинях сальних порід, встановлено ще один цитозольний ізозим МДГ [1, 3]. Вважають, що виявлений ізозим бере участь у відновленні НАДФ і забезпечує синтез ліпідів. Однією з найбільш суттєвих відмінностей між МДГ1 і МДГ2 є різниця в заряді: МДГ1 характеризується більшим зарядом, ніж МДГ2.

Вміст ізозимів не постійний, а утворення нових ізозимів МДГ залежить від віку, застосування речовин, які впливають на окремі ланки метаболізму і на організм тварин в цілому [12, 5, 13].

Малатдегідрогеназа виявлена у тканинах репродуктивних органів самок. Встановлено, що активність ензиму забезпечує ріст і розвиток ооцитів, ембріонів та їх приживлення [7, 9, 15, 6].

Мета досліджень — вивчити активність та вміст ізозимів малатдегідрогенази у тканинах яєчників, ендометрію й антральній рідині фолікулів залежно від фолікуло- та лютеогенезу й за гіпофункції гонад корів.

Матеріали і методи

Для досліджень підібрані клінічно здорові корови-аналоги української чорно-рябої молочної породи, віком 4–8 років, з масою тіла 450–550 кг. Після забою у корів відбирали яєчники та верхню третину рогів матки. Яєчники оцінювали за фізіологічним станом [8]: фолікулярний ріст (без жовтого тіла); 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) та з гіпофункцією (на поверхні виявляються поодинокі фолікули діаметром менше 4 мм, тканина

пружна). Досліджували: тканину яєчників, слизову матки з верхньої третини рогу, антральну рідину з фолікулів діаметром до 4 мм (малі), 4–7 мм (середні) і понад 7 мм (великі). Зразки тканин для досліджень готували таким чином: яєчники промивали фізіологічним розчином за температури 0–2 °С, аспірували антральну рідину з фолікулів залежно від розміру; слизову матки відпрепарували від міометрію. Тканини подрібнювали і гомогенізували в гомогенізаторі Поттера. Середовище гомогенізації тканини яєчників і слизової матки містило 250 мМ розчину сахарози та 10 мМ буферу тріс-НСІ (рН 7,4). Отриманий гомогенат центрифугували при 3000 об/хв. Визначали: вміст загального протеїну (мг/мл) методом Лоурі, активність малатдегідрогенази (МДГ) — за швидкістю окиснення НАДН (нмоль/хв×мг білка). Для виявлення ізоформ МДГ проводили електрофорез у 7,5 % поліакриламідному гелі (ПААГ): зразки 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 [4, 14]: інкубували 60 хв в темному місці за температури 37 °С 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). У місцях локалізації ензиму гель набуває фіолетового забарвлення. Статистичний аналіз отриманих результатів проведено за М. О. Плохінським [11].

Результати й обговорення

Встановлено, що, залежно від фізіологічного стану, активність МДГ висока у тканині яєчника за фолікулярного росту ($1,0 \pm 0,21$ нмоль/хв×мг білка), нижча на 20,0 % за раннього жовтого тіла і найнижча за пізнього жовтого тіла ($0,6 \pm 0,16$ нмоль/хв×мг білка; табл. 1). За гіпофункції статевої залози активність ензиму, порівняно з фізіологічними станами, на 33,3–60,0 % нижча. Різниця між максимальною і мінімальною величинами значень статистично вірогідна ($P < 0,05$).

Аналіз залежності активності ензиму від фізіологічного стану яєчника свідчить

Активність малатдегідрогенази в тканинах репродуктивних органів корів (нмоль/хв×мг білка)
 Malate dehydrogenase activity in tissues of cow reproductive organs (nmol/min×mg of protein)

Тканина / Tissue	Раннє жовте тіло Early corpus luteum		Пізнє жовте тіло Late corpus luteum		Фолікулярний ріст Follicular growth		Гіпофункція Hypofunction		η
	n	M±m	n	M±m	n	M±m	n	M±m	
Яєчник / Ovary	14	0,8±0,19	7	0,6±0,16	11	1,0±0,21*	4	0,4±0,10	0,353
Ендометрій / Endometrium	3	0,9±0,22	4	1,3±0,04***	4	1,1±0,11**	5	0,4±0,11	0,799
Антральна рідина з фолікулів діаметром (мм) / Antral fluid from follicles with diameter (mm)									
>7	3	0,4±0,14	3	0,6±0,22	6	1,3±0,41	–	–	–
4–7	3	0,6±0,17	3	0,7±0,26	6	1,1±0,40	–	–	–
<4	3	0,3±0,13	4	0,5±0,13	7	1,6±0,46	4	0,4±0,06	–
η	0,389		0,161		0,187		–		–

Примітка: різниця статистично вірогідна порівняно з мінімальною величиною значення: * — P<0,05; ** — P<0,01; *** — P<0,001

Note: the difference is statistically significant compared to minimal value: * — P<0.05; ** — P<0.01; *** — P<0.001

про кореляцію слабкої сили ($\eta=0,266$), проте залежність активності ензиму від фізіологічного стану і гіпофункції яєчника середньої сили ($\eta=0,353$). Отже, активність МДГ за гіпофункції яєчника характеризує понижене перетворення субстрату (оксалоацетату чи малату) для забезпечення функцій статевої залози.

Подібні результати отримані при дослідженні активності МДГ в ендометрії. Високі величини значень активності ензиму у слизовій матки виявлені за фізіологічних станів яєчника (0,9–1,3 нмоль/хв×мг білка) і на 55,6–69,3 % нижчі за гіпофункції. Різниця між активністю МДГ в ендометрії за яєчників фолікулярного росту і пізнього жовтого тіла та гіпофункції статистично вірогідна ($P<0,01–0,001$). Кореляційне відношення для активності ензиму в ендометрії за фізіологічних станів середньої сили ($\eta=0,450$), а за фізіологічних станів і гіпофункції — сильне ($\eta=0,799$). Таким чином, в ендометрії за гіпофункції яєчника понижене використання субстрату для ймовірного запліднення, закріплення зиготи і розвитку плода.

Дослідженням активності ензиму в антральній рідині фолікулів залежно від фізіологічних станів яєчника встановлено: за фолікулярного росту активність МДГ висока з фолікулів розмірами до 4 мм, за пізнього і раннього жовтого тіла $\frac{3}{4}$ з фолікулів 4–7 мм. Активність МДГ в антральній рідині з фолікулів яєчника за гіпофункції не відрізняється від аналогів пізнього та раннього жовтого тіла і становить $0,4\pm 0,06$ нмоль/хв×мг білка. Встановлені особливості активності ензиму в антральній рідині

ні свідчать про потребу в субстратах ростучих ооцитів з малих і середніх фолікулів яєчників фолікулярного росту та з жовтим тілом. Величина активності МДГ з малих фолікулів яєчника за гіпофункції свідчить про потенційну можливість забезпечувати функції клітин гранульози і теки та розвиток ооцита.

Електрофорезом тканин репродуктивних органів корів і антральної рідини з фолікулів яєчників виявлено три смуги протеїнів, які проявляли активність малатдегідрогенази (рис. 1).

Смуги протеїнів МДГ характеризуються різною інтенсивністю та площею зафарбування, що вказує на неоднакову участь ізозимів ензиму в процесах постачання і використання малату в мітохондріях. Встановлено, що вміст МДГ1 та МДГ2 у тканинах яєчника майже однаковий і коливається в межах 33,7–44,9 %, а вміст МДГ3 — 18,8–27,1 % (табл. 2). У тканині ендометрію основна частина вмісту ізозимів припадає на МДГ2 (36,0–56,7 %) і менша — на МДГ1 (26,5–35,2 %) та МДГ3 (16,7–29,0 %).

Аналіз вмісту ізозимів залежно від стану яєчника свідчить, що вища величина значення МДГ1 ($42,8\pm 7,42$ %) і нижча МДГ2 ($33,7\pm 7,87$ %) проявляється за гіпофункції порівняно з фізіологічними станами. В ендометрії виявлено подібну залежність: вміст МДГ2 понижений ($36,0\pm 6,15$ %), а МДГ3 — навпаки, підвищений ($29,0\pm 4,26$ %). Аналіз залежності вмісту ізозимів ензиму від фізіологічного стану яєчника свідчить про слабку силу кореляції (МДГ1 — $\eta=0,031$; МДГ2 — $\eta=0,126$;

МДГЗ — $\eta=0,250$). Подібна сила кореляції залежності встановлена між вмістом ізозимів МДГ1 і МДГ2 та фізіологічними станами й гіпофункцією яєчника ($\eta=0,094-0,114$). Однак для вмісту МДГЗ за зміни фізіологічних станів й гіпофункції яєчника кореляційне відношення середньої сили ($\eta=0,509$).

В антральній рідині з фолікулів статевих залоз найвищий вміст МДГ1 виявлено з яєчника раннього жовтого тіла (52,5–60,9%), МДГ2 — з пізнього жовтого тіла (43,9–56,1%), а МДГЗ — з фолікулярного росту (27,7–41,8%; табл. 3). Для яєчника за гіпофункції характерна присутність малих фолікулів, в антральній рідині яких вміст ізозимів МДГ1, МДГ2 і МДГЗ характеризується середніми величинами 44,9%,

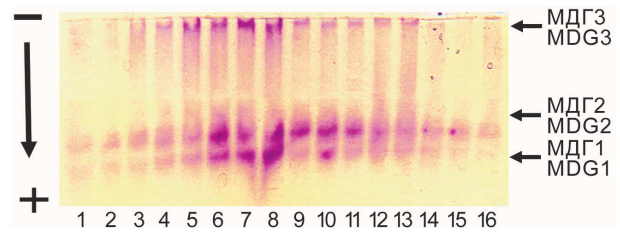


Рис. 1. Ізозими МДГ тканин репродуктивних органів корів: яєчники: 1–4 — фолікулярний ріст; 5, 7, 9 — раннє жовте тіло; 11–13 — гіпофункція; ендометрій за стану яєчника: 6 — фолікулярний ріст; 8, 10 — раннє жовте тіло, 14–16 — гіпофункція

Pic. 1. MDG isozymes of cow reproductive organs' tissues: in ovaries: 1–4 — follicle growth; 5, 7, 9 — early corpus luteum; 11–13 — hypofunction; in ovarian endometrium: 6 — follicle growth; 8, 10 — early corpus luteum; 14–16 — hypofunction

Вміст ізозимів малатдегідрогенази у тканинах репродуктивних органів корів (M±m)
Malate dehydrogenase isozyme content in tissues of cow reproductive organs (M±m)

Таблиця 2

Тканина за фізіологічного стану статевої залози Tissue at physiological state of gonad	n	Вміст ізозимів, % Content of isozymes, %		
		МДГ1 / MDG1	МДГ2 / MDG2	МДГ3 / MDG3
<i>Яєчник / Ovary</i>				
Фолікулярний ріст / Follicle growth	20	34,8±6,16	38,9±5,42	25,0±3,55
Пізнє жовте тіло / Late corpus luteum	12	36,3±6,39	44,9±6,03	18,8±2,62
Раннє жовте тіло / Early corpus luteum	20	34,5±6,19	38,3±6,74	27,1±4,54
Гіпофункція / Hypofunction	12	42,8±7,42	33,7±7,87	24,0±3,04
η	–	0,114	0,094	0,509
<i>Слизова матки / Endometrium</i>				
Фолікулярний ріст / Follicle growth	8	35,2±6,33	40,0±7,20	24,7±7,54
Пізнє жовте тіло / Late corpus luteum	11	26,5±7,31	56,7±8,09	16,7±4,19
Раннє жовте тіло / Early corpus luteum	8	32,0±5,69	45,5±7,87	22,8±4,70
Гіпофункція / Hypofunction	13	34,9±4,75	36,0±6,15	29,0±4,26
η	–	0,181	0,325	0,273

Вміст ізозимів малатдегідрогенази в антральній рідині фолікулів яєчників (M±m)
Malate dehydrogenase isozyme content in antral fluid of ovarian follicles (M±m)

Таблиця 3

Діаметр фолікулів, мм / Follicle diameter, mm	n	Вміст ізозимів / Content of isozymes, %		
		МДГ1 / MDG1	МДГ2 / MDG2	МДГ3 / MDG3
<i>Фолікулярний ріст / Follicle growth</i>				
>7	11	26,6±6,52	31,4±7,07	41,8±7,06
4–7	11	30,2±6,06	36,2±6,17	33,6±6,28
<4	10	37,8±8,10	34,5±7,83	27,7±8,01
η	–	0,209	0,094	0,252
<i>Пізнє жовте тіло / Late corpus luteum</i>				
>7	10	22,9±6,53	56,1±6,83	20,9±3,52
4–7	9	34,8±10,08	50,3±11,27	14,8±4,57
<4	8	39,0±11,73	43,9±11,38	17,1±6,52
η	–	0,238	0,164	0,176
<i>Раннє жовте тіло / Early corpus luteum</i>				
>7	4	60,9±6,76	15,7±1,64	23,4±7,75
4–7	4	58,9±6,95	21,5±3,53	19,6±4,28
<4	4	52,5±6,25	18,9±3,02	28,6±5,93
η	–	0,260	0,382	0,286
<i>Гіпофункція / Hypofunction</i>				
<4	10	44,9±6,12	33,2±6,85	21,8±3,18

33,2 % і 21,8 % відповідно. Таким чином, високий вміст МДГ1 в антральній рідині з фолікулів яєчника за раннього жовтого тіла вказує на інтенсивне постачання субстрату в мітохондрії, МДГ2 і МДГ3 за пізнього жовтого тіла та фолікулярного росту — використання для функціонування циклу трикарбонових кислот і ресинтезу АТФ. Середні величини вмісту ізозимів МДГ в антральній рідині з фолікулів яєчника за гіпофункції характеризує здатність клітин фолікулів забезпечувати розвиток ооцита.

Аналіз вмісту ізозимів в антральній рідині за одного і того ж фізіологічного стану яєчника, але з різних за розміром фолікулів свідчить, що за пропорційного збільшення розміру фолікула статевих залоз фолікулярного росту і пізнього жовтого тіла проявляється тенденція до зниження вмісту МДГ1 на 5,2–16,1 % і, навпаки, до зростання МДГ3 на 3,8–14,1 %. Поряд з цим, вміст МДГ2 в антральній рідині з фолікулів яєчника за фолікулярного росту, незалежно від розміру, був у межах 31,4–36,2, а за пізнього жовтого тіла проявляв тенденцію до підвищення (на 7,0–12,2 %) зі збільшенням величини фолікулів. У яєчнику за раннього жовтого тіла зі збільшенням розміру фолікулів вміст МДГ1 підвищується на 2,0–6,3 %, а МДГ2 проявляє максимум ($21,5 \pm 3,53$ %) за 2–7 мм і МДГ3 ($28,6 \pm 5,93$ %) за розміру менше 4 мм. Аналіз кореляцій між розміром фолікула і вмістом ізозимів МДГ залежно від фізіологічного стану яєчника слабкої сили ($\eta=0,094-0,286$). Виняток становить вміст МДГ2 у фолікулах яєчника раннього жовтого тіла $\frac{3}{4}$ кореляційне відношення криволінійне середньої сили ($\eta=0,382$). Таким чином, виявлені тенденції до зниження вмісту МДГ1 і підвищення МДГ3 в антральній рідині за збільшення розміру фолікулів яєчників за фолікулярного росту та пізнього жовтого тіла характеризують особливості метаболізму і потреби ооцитів.

З результатів досліджень випливає, що в тканині матки і яєчників за фізіологічних станів відбуваються процеси, які забезпечують ріст і виділення домінуючого фолікула й підготовку ендометрію до приживлення ембріонів. Зокрема, у тканинах репродуктивних органів корів зростає вміст МДГ2, що може свідчити про нагромадження поживних речовин

для забезпечення росту фолікулів. Висновок підтверджується результатами досліджень, якими встановлено, що висока активність малат-аспартатного шунта забезпечує розвиток ембріонів, їх прикріплення в матці і ріст плодів мишей [10]. За гіпофункції статевої залози у тканині матки і яєчників корів понижена активність МДГ свідчить про слабку здатність клітин використовувати субстрати і ресинтезувати АТФ. При цьому перетворення оксалоацетату в малат в цитозолі за участі МДГ1 забезпечує підтримання функцій тканин, але недостатнє для забезпечення росту і дозрівання фолікулів. Такий висновок узгоджується зі зростаючою активністю ензиму в антральній рідині фолікулів, яка поступово підвищується зі зміною фізіологічного стану яєчника: ранне жовте тіло → пізнє жовте тіло → фолікулярний ріст. При цьому особливістю антральної рідини фолікулів (клітин гранульози і теки) яєчника раннього жовтого тіла є інтенсивне постачання малату з цитозолі в мітохондрії та зниження вмісту МДГ1 за пізнього жовтого тіла і фолікулярного росту. Встановлені зміни свідчать про поступове гальмування використання субстратів, що зумовлено зниженням потреб у ресинтезі АТФ клітин фолікула яєчників впродовж їх розвитку. Отримані результати підтверджуються ще й залежністю вмісту ізозимів МДГ антральної рідини від розміру фолікула. Збільшення розміру фолікула в яєчниках за пізнього жовтого тіла і фолікулярного росту характеризує в антральній рідині поступове зменшення потреби клітин в постачанні субстрату (малату) в мітохондрії і навпаки, інтенсивне постачання субстрату з цитозоллю в мітохондрії за раннього жовтого тіла. Виявлені особливості активності і вмісту ізозимів МДГ в антральній рідині свідчать про зниження потреб в енергії ооцитів як регуляторів окисного метаболізму [16].

Висновки

1. Активність МДГ в тканині яєчника й ендометрії залежить від фізіологічного стану статевої залози: у тканині яєчника висока за фолікулярного росту ($1,0 \pm 0,21$ нмоль/хв×мг білка), на 20,0 % нижча за раннього жовто-

го тіла і найнижча за пізнього жовтого тіла ($0,6 \pm 0,16$ нмоль/хв \times мг білка); у слизовій матці висока за фізіологічних станів яєчника ($0,9-1,3$ нмоль/хв \times мг білка) і на $55,6-69,3$ % нижча за гіпофункції.

2. В антральній рідині фолікулів яєчників за фолікулярного росту активність МДГ висока ($1,6 \pm 0,46$ нмоль/хв \times мг білка) з фолікулів розмірами <4 мм, за пізнього і раннього жовтого тіла $\frac{3}{4}$ з фолікулів $4-7$ мм ($0,6-0,7$ нмоль/хв \times мг білка), а за гіпофункції $\frac{3}{4}$ $0,4 \pm 0,06$ нмоль/хв \times мг білка.

3. Для тканин репродуктивних органів і антральної рідини з фолікулів яєчників корів характерні три смуги активних протеїнів малатдегідрогенази, які за електрофоретичною рухливістю відповідають цитозольним (МДГ1 і МДГ2) і мітохондріальному ізозимам (МДГ3). У тканині яєчника вміст МДГ1 та МДГ2 майже однаковий ($33,7-44,9$ %), а вміст МДГ3 становить $18,8-27,1$ %; в ендометрії основна частина вмісту припадає на МДГ2 ($36,0-56,7$ %), менша частка — на МДГ1 ($26,5-35,2$ %) та МДГ3 ($16,7-29,0$ %). В антральній рідині з фолікулів статевих залоз найвищий вміст МДГ1 з яєчника за раннього жовтого тіла ($52,5-60,9$ %), МДГ2 — за пізнього жовтого тіла ($43,9-56,1$ %), а МДГ3 — за фолікулярного росту ($27,7-41,8$ %).

4. Активність МДГ зі зміною фізіологічного стану і гіпофункцією яєчника проявляє кореляцію: у тканині статевої залози — середньої сили ($\eta=0,353$), в ендометрії — сильну ($\eta=0,799$). При цьому вміст МДГ3 у тканині статевої залози і МДГ2 в ендометрії зі зміною фізіологічного стану і за гіпофункції яєчника корелює з середньою силою ($\eta=0,509$ і $\eta=0,325$ відповідно).

5. Кореляційне відношення за розміром фолікулів яєчника раннього жовтого тіла для вмісту МДГ2 в антральній рідині криволінійне середньої сили ($\eta=0,382$).

Перспективи подальших досліджень.

Вивчити активність і вміст ізозимів аспартатамінотрансферази в тканинах яєчників і матки у корів на різних стадіях фолікуло- та лютеогенезу.

1. Al-Harbi M. S. Tissue-specific isoenzyme variations in Arabian camel. *Camelus dromedaries. Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2012, vol. 3, pp. 863–868.

2. Daniš P, Farkas R. Hormone-dependent and hormone-independent control of metabolic and devel-

opmental functions of malate. *Endocrine regulations*, 2009, vol. 43, pp. 39–52.

3. Dumollard R., Ward Z., Carroll J., Duchen M. R. Regulation of redox metabolism in the mouse oocyte and embryo. *Development*, 2007, vol. 134, pp. 455–465.

4. Garbus J. Serum malate dehydrogenase isoenzymes as indicators of severe cellular injury. *Clin. Chim. Acta*, 1971, vol. 35, pp. 502–504.

5. Guimaraes A., da Cunha R. M. S., de Vasconcelos P. R. L., Guimaraes S. B. Glutamine and ornithine alpha-ketoglutarate supplementation on malate dehydrogenases expression in hepatectomized rats. *Acta Cirurgica Brasileira*, 2014, vol. 29, no. 6, pp. 366–371.

6. Huzyevaty O. Ye., Yasinsky V. V., Smulka L. V., Kolehko T. A. Evaluation of the functional state of the cow oocyte-cumulus complexes depending on the type of ovary. *Journal of Agricultural Science*, 1995, no. 11, pp. 94–98. (in Ukrainian)

7. Lane M., Gardner D. K. Mitochondrial malate-aspartate shuttle regulates mouse embryo nutrient consumption. *J. Biol. Chem.*, 2005, vol. 280, pp. 18361–18367.

8. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Fair A. L., Randall R. J. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, vol. 193, pp. 264–275.

9. Mitchell M., Kara S., Cashman D., Gardner K., Jeremy G., Michelle T. Lane Disruption of Mitochondrial Malate-Aspartate Shuttle Activity in Mouse Blastocysts Impairs Viability and Fetal Growth. *Biology of Reproduction*, 2009, vol. 80, no. 2, pp. 295–301.

10. Minárik P, Tomáková N, Kollárová M, Antálík M. Malate Dehydrogenases — Structure and Function Gen. *Physiol. Biophys.*, 2002, vol. 21, pp. 257–265.

11. Plohinsky N. A. *Biometriya*. Moscow, MGU, 1970, pp. 53–60. (in Russian)

12. Sharma R., Patnaik S. K. Differential Regulation of Malate Dehydrogenase Isoenzymes by Hydrocortisone in the Liver and Brain of Aging Rats. *Embryologia*, 2008, vol. 24, no. 5, pp. 501–505.

13. Shyamal K., Dalores R., Terada M. Activities of Glucose Metabolic Enzymes in Human Preantral Follicles: *In Vitro* Modulation by Follicle-Stimulating Hormone, Luteinizing Hormone, Epidermal Growth Factor, Insulin-Like Growth Factor I, and Transforming Growth Factor $\beta 1$. *Biology of Reproduction*, 1999, vol. 60, no. 3, pp. 763–768.

14. Vlizlo V. V., Fedoruk R. S., Ratych I. B. *Laboratory methods of research in biology, animal husbandry and veterinary medicine*. Lviv, Navy, 2012, p. 764. (in Ukrainian)

15. Wale P. L., Gardner D. K. Oxygen Regulates Amino Acid Turnover and Carbohydrate Uptake During the Preimplantation Period of Mouse Embryo Development. *Biology of Reproduction*, 2012, vol. 87, pp. 1–24.

16. Zhou S. L, Li M. Z., Li Q. H., Guan J. Q., Li X. W. Differential expression analysis of porcine MDH1, MDH2 and ME1 genes in adipose tissues. *Genet. Mol. Res.*, 2012, vol. 11, no. 2, pp. 1254–1259.