

ВПЛИВ ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ ЧИННИКІВ НА ПРОЦЕСИ ПРОЛІФЕРАТИВНОЇ І ФУНКЦІОНАЛЬНОЇ ЗДАТНОСТІ КУЛЬТУРИ КЛІТИН ЯЙЦЕПРОВОДІВ ТА ЕНДОМЕТРІЮ КОРІВ

Ю. І. Сливчук, І. І. Розгоні, І. І. Гевкан, В. Я. Сирватка

Інститут біології тварин НААН

Встановлено стимулюючий вплив електромагнітного поля надвисокої частоти (ЕМП НВЧ) та сукцинату натрію на проліферацію клітин яйцепроводів та ендометрію корів аналогічний до дії ростових факторів та інших фізико-хімічних чинників. Доведено, що 6-хвилинна обробка культури клітин двох типів після розморожування та додавання до основного середовища (ОС) сукцинату натрію в дозі 400 мкг/см³ має виражений стимулюючий вплив на проліферативну активність культури клітин яйцепроводів та ендометрію корів у порівнянні з контрольною групою, клітини якої культивувались в ОС з пірватом натрію.

Ключові слова: ЯЙЦЕПРОВОДИ, ЕНДОМЕТРІЙ, КУЛЬТУРА КЛІТИН, ОСНОВНЕ СЕРЕДОВИЩЕ, СУКЦИНАТ НАТРІЮ, ПРОЛІФЕРАЦІЯ КЛІТИН

Важливим аспектом біотехнології відтворення тварин є отримання, накопичення та збереження культур клітин з репродуктивних органів самиць певного фізіологічного стану. Субкультура клітин з яйцепроводів і матки здатна слугувати клітинною моделлю процесів, що відбуваються у яйцепроводах самок на різних фазах статевого циклу, у процесах запліднення та імплантації ембріона. За умов додавання до середовища певних інгредієнтів вона здатна проявляти властивості специфічного клітинного матриксу.

Проблема забезпечення клітинної проліферації є далекою від вирішення, хоча в останні роки з'явилося досить багато робіт, які показують роль факторів росту та ендогенних інгібіторів клітинної проліферації. Проблемі регуляції відновлювальних процесів присвячена монографія Л. К. Романової (1984) [1], в якій основну увагу приділено регуляції процесів проліферації клітин. Колективом лабораторії зроблені спроби застосовувати (ЕМП НВЧ) та сукцинат натрію як стимулятор клітинного розмноження [2, 3]. Проведеними нами раніше дослідженнями виявлено, що ЕМП НВЧ та сукцинат натрію призводить до посилення активності проліферації клітин.

Електромагнітне поле, взаємодіючи з клітинними мембранами, формує тривало існуючі білкові підструктури, які генерують надвисокочастотні коливання. Ці коливання мають частоту характерну для нормального функціонування і можуть передаватися наступним генераціям клітин. За допомогою електромагнітних полів можна змінювати швидкість біохімічних реакцій, що перебігають у біологічних системах. ЕМП з відповідною частотою змінної складової збільшує позитивну дію біологічно активних речовин, посилює активність проліферації клітин. [4, 5]. Сукцинат (янтарна кислота), її солі і ефіри представляють собою універсальний внутріклітинний метаболіт, який за рахунок феномену швидкого окислення в цитоплазмі, що супроводжується швидким ресинтезом АТФ, покращує оксигенацію внутрішнього середовища, стабілізує структуру і функціональну активність мітохондрій, посилює синтез деяких білків та іонний обмін в клітині [6, 7]. Враховуючи унікальну різнобічність проявів біологічної активності ЕМП НВЧ і метаболіту циклу лимонної кислоти — сукцинату та його солей при культивуванні клітин, дослідження в цьому напрямку є перспективними і актуальними.

Метою наших досліджень було вивчити сумісний вплив фізико-хімічних чинників — ЕМП НВЧ та сукцинату натрію на процеси проліферативної і функціональної здатності культури клітин яйцепроводів та ендометрію корів після розморожування.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на розмороженій культурі клітин ендометрія та яйцепроводів корів. Культуру клітин із рідкого азоту пінцетом швидко переносили у водяну баню на 1–2 хв. при температурі 38,5 °С. Розморожену суспензію клітин вносили у центрифужну пробірку і розводили у 5–10 разів основним культуральним середовищем (ОС), яке складається з TC-199, 0,4 % BSA, 4 мкг/см³ гентаміцину, 1 мкг/см³ естрадіолу, 10 мкг/см³ фолікотропіну, α - глютаміну, 0,2 мкг/см³ преднізолону, 20 мкг/см³ інсулін та витримували 12 годин в термостаті за температури 38,5 °С для віталізації. Через 12 годин суспензію центрифугували 5 хв при 1000 (об/хв) надосадову рідину видаляли, до осаду додавали свіжого ОС і ресуспендували. Кількість клітин підраховували у камері Горяєва, розраховували посівну концентрацію і висівали у чашки Петрі. До основного середовища в дослідних групах замість пірувату натрію додавали 400 мкг/см³ сукцинату натрію. Для обробки культури клітин ЕМП НВЧ використано прилад «Політон» з діапазоном частоти 30–300 ГГц (табл. 1).

Таблиця 1

Схема досліджень впливу ЕМП НВЧ та сукцинату натрію на розморожені клітини двох типів (M $\pm$ m, n=3)

Групи	Характеристика груп	Маніпуляції
<i>Культура клітин яйцепроводів / культура клітин ендометрію</i>		
Контрольна	ОС	Пересів клітин через кожні 24 год. культивування, оцінка проліф. росту, біохімічні дослідження кондиційного середовища
Дослідна 1	ОС+ЕМП НВЧ 1 раз - 6 хв. під час посіву	
Дослідна 2	ОС+сукцинат натрію 400 мкг/см ³	
Дослідна 3	ОС+ЕМП НВЧ 1 раз - 6 хв. під час посіву +сукцинат натрію 400 мкг/см ³	

Оцінку проліферативної та функціональної активності культури клітин яйцепроводів корів проводили за визначенням концентрації клітин і результатами біохімічних досліджень середовища. Для цього через кожні 24 години культивування, впродовж 3 діб, проведено відбір середовища для біохімічних досліджень з визначення вмісту загального білка, глюкози, кальцію і фосфору.

Результати й обговорення

У результаті проведених досліджень були одержані дані про динаміку проліферативної активності розмороженої культури клітин яйцепроводів в залежності від застосування фізико-хімічних чинників (табл. 2).

Таблиця 2

Вивчення впливу ЕМП НВЧ та сукцинату Na на розморожену культуру клітин яйцепроводів корів за умов безпосередньої на них дії (M $\pm$ m, n=3)

Групи та стат. обробка результатів	Посівна концентрація клітин $\times 10^6$ /см ³	Концентрація клітин $\times 10^6$ /см ³		
		через 24 год	через 48 год	через 72 год
К контроль	0,6	3,00 $\pm$ 0,17	4,26 $\pm$ 0,05	5,14 $\pm$ 0,02
Д ₁ -ОС+ЕМП НВЧ 6 хв на культуру клітин	0,6	3,28 $\pm$ 0,03***	5,55 $\pm$ 0,03***	6,84 $\pm$ 0,02***
Д ₂ -ОС+сукцинат 400 мкг/см ³	0,6	5,24 $\pm$ 0,02***	5,44 $\pm$ 0,03***	7,07 $\pm$ 0,04***
Д ₃ -ОС+сукцинат 400 мкг/см ³ + ЕМП НВЧ 6 хв на культуру клітин	0,6	5,18 $\pm$ 0,02***	5,75 $\pm$ 0,03***	6,13 $\pm$ 0,05***

Примітка: у цій та наступних таблицях p < 0,1 — *, p < 0,01 — **, p < 0,001 — ***

На 24 годину культивування найвища концентрація клітин виявлена у 2 та 3 дослідних групах за дії сукцинату та сумісної дії сукцинату натрію та ЕМП НВЧ. Тоді, як у 1 дослідній групі, кількість клітин знаходилась на рівні відповідного показника контрольної групи. Концентрація клітин усіх дослідних груп на 48 годину культивування була на одному рівні та перевищувала відповідну концентрацію клітин яйцепроводів у контрольній групі в 1,4 раза. У 1 та 2 дослідних групах концентрація клітин на 72 годину культивування була найвищою і становила $6,84 \pm 0,02$ та $7,07 \pm 0,04$ млн/см³ проти $5,14 \pm 0,02$ у контрольній та $6,13 \pm 0,05$ в 3 дослідній групі.

Динаміка біохімічних показників середовища в якому культивувались клітини яйцепроводів за дії фізико хімічних чинників представлена у таблиці 3. Виявлене зниження активності лактатдегідрогенази та концентрації глюкози через кожних 24 години культивування в кондиційному середовищі усіх дослідних груп можна пояснити посиленням рівнем біосинтетичних процесів в клітинах у результаті інтенсивної проліферації клітин.

Таблиця 3

Динаміка біохімічних показників середовища в якому культивувались клітини яйцепроводів за дії фізико хімічних чинників (ЕМП НВЧ та сукцинату натрію)

Дослідні групи	Термін культивування год.	Біохімічні показники				
		Glu	LDH	ALP	Ca	P
		g/l	UI/L	UI/L	mmol/L	mmol/L
Основне середовище	—	$5,9 \pm 0,1$	—	—	$2,33 \pm 0,01$	$1,38 \pm 0,02$
Контроль	24	$0,25 \pm 0,03$	$18,1 \pm 0,05$	$18,7 \pm 1,1$	$2,32 \pm 0,05$	$0,82 \pm 0,1$
	48	$0,19 \pm 0,02$	—	$10,08 \pm 0,05$	$2,24 \pm 0,06$	$0,91 \pm 0,04$
	72	$0,17 \pm 0,01$	—	$5,13 \pm 0,1$	$1,94 \pm 0,03$	$0,68 \pm 0,06$
Д ₁ ОС +ЕМП НВЧ 6 хв на культуру клітин	24	$0,25 \pm 0,03$	$15,4 \pm 0,2^{***}$	$23,7 \pm 1,7$	$2,5 \pm 0,03^*$	$0,6 \pm 0,08$
	48	$0,22 \pm 0,05$	—	$7,87 \pm 0,02^{***}$	$1,99 \pm 0,05^*$	$0,71 \pm 0,005^{**}$
	72	$0,17 \pm 0,05$	—	$5,5 \pm 0,07^*$	$2,16 \pm 0,02^{**}$	$0,74 \pm 0,02$
Д ₂ ОС +сукцинат натрію 400 мкг/см ³	24	$0,17 \pm 0,05$	$13,7 \pm 0,1^{***}$	$16,3 \pm 1,1$	$2,23 \pm 0,05$	$0,68 \pm 0,02$
	48	$0,15 \pm 0,03$	—	$14,2 \pm 0,1^{***}$	$2,14 \pm 0,04$	$0,79 \pm 0,04$
	72	$0,32 \pm 0,05$	—	$14,78 \pm 0,05^{***}$	$2,06 \pm 0,04^*$	$0,75 \pm 0,01$
Д ₃ ОС + сукцинат натрію 400 мкг/см ³ +ЕМП НВЧ 6хв на культуру клітин	24	$0,2 \pm 0,03$	$11,22 \pm 0,07$	$21,3 \pm 0,6$	$2,32 \pm 0,07$	$0,57 \pm 0,02^*$
	48	$0,25 \pm 0,03$	—	$10,1 \pm 0,08$	$2,17 \pm 0,2$	$0,33 \pm 0,1^{**}$
	72	$0,23 \pm 0,15$	—	$5,15 \pm 0,01$	$2,08 \pm 0,08$	$0,79 \pm 0,04$

Підвищення активності лужної фосфатази у 1 та 3 дослідній групах в яких застосовували ЕМП НВЧ на 24 годину культивування, вказує на наявність посилених обмінних процесів, які відбуваються в клітинах після обробки електромагнітним полем і потребують значних енергетичних затрат. Зниження вмісту кальцію на 48 та 72 годину культивування клітин яйцепроводів корів можна пояснити підвищеною АТФ активністю. Впродовж 72-годинного культивування клітин яйцепроводів на тлі підвищеної активності проліферації клітин в усіх дослідних і контрольній групах виявлено інтенсивне зниження концентрації фосфору в порівнянні з його концентрацією в ОС, який використовується для синтезу нуклеїнових кислот та енергетичних сполук.

Результати досліджень з впливу сумісної дії ЕМП НВЧ та сукцинату натрію на проліферативну активність клітин ендометрію корів представлені в таблиці 3. Збільшення концентрації клітин виявлено у 2 та 3 дослідних групах на 24 годину культивування. На 48 годину культивування в усіх дослідних групах спостерігалася однакова активність проліферації, яка перевищувала відповідну у контрольній групі у 1,4 раза та була аналогічною до відповідних показників при культивуванні клітин яйцепроводів. На 72 годину культивування клітин ендометрію спостерігається підвищення рівня проліферації клітин у 2 дослідній групі, де до середовища додавали сукцинат натрію, концентрація клітин становила $(8,71 \pm 0,20) \times 10^6$ та у 3 дослідній групі за умов сумісної дії ЕМП НВЧ та сукцинату натрію — $(9,00 \pm 0,20) \times 10^6$ проти $(6,09 \pm 0,06) \times 10^6$ в 1 см³ у контролі. Отже, застосування сукцинату натрію та ЕМП НВЧ окремо і сумісно зумовило підвищення активності проліферації клітин яйцепроводів та ендометрію в усіх дослідних групах впродовж 72-годинного культивування.

Таблиця 4

Вивчення впливу ЕМП НВЧ та сукцинату Na на проліферацію клітин розмороженої культури ендометрію корів за умов безпосередньої на них дії ($M \pm m$, $n=3$)

Групи та стат. обробка результатів	Посівна концентрація клітин $\times 10^6$ /см ³	Концентрація клітин $\times 10^6$ /см ³		
		через 24 год	через 48 год	через 72 год
К контроль	0,6	4.10 ± 0.06	5.53 ± 0.07	6.09 ± 0.06
Д ₁ -ОС+ЕМП НВЧ 6 хв на культуру клітин	0,6	4.14 ± 0.10	$7.16 \pm 0.05^{***}$	$7.73 \pm 0.07^{***}$
Д ₂ -ОС+сукцинат 400 мкг/см ³	0,6	$4.47 \pm 0.08^{**}$	$7.40 \pm 0.07^{***}$	$8.71 \pm 0.20^{***}$
Д ₃ -ОС+сукцинат 400 мкг/см ³ + ЕМП НВЧ 6 хв на культуру клітин	0,6	$4.45 \pm 0.06^{***}$	$7.55 \pm 0.06^{***}$	$9.00 \pm 0.20^{***}$

У таблиці 5 представлені біохімічні показники відібраного середовища при пересіві клітин ендометрію корів за умов дії на них ЕМП НВЧ та сукцинату натрію впродовж 72 годин культивування.

Впродовж перших 24 годин культивування встановлено зниження вмісту в кондиційному середовищі концентрації глюкози вже на 3-тю годину культивування, через 6 годин вміст її знижується майже в два рази, на 12 годину — більш ніж в чотири рази, а на 24 годину культивування в 60 раз порівняно зі стартовим показником в основному середовищі. Це вказує на активацію проліферативних процесів у культурах клітин ендометрію, що супроводжується підвищеним рівнем біосинтетичних процесів в культурі клітин, які потребують значних енергетичних затрат. Зниження вмісту глюкози спостерігається через кожні 24 години під час пересіву клітин впродовж 72 годинного культивування. Відносно стабільний рівень калію і натрію вказує на підтримання гомеостазу.

При подальшому культивуванні на 48 годину в 1 та 3 дослідних групах клітин ендометрію матки корів, в яких використовували ЕМП НВЧ для стимуляції проліферативного росту, виявлено тенденцію до зростання вмісту кальцію при одночасному зниженні вмісту фосфору, що вказує на наявність посиленних обмінних процесів.

Динаміка біохімічних показників середовища в якому культивувались клітини ендометрію за дії фізико-хімічних чинників (ЕМП НВЧ та сукцинату натрію)

Дослідні групи	Термін культивування год.	Біохімічні показники				
		Glu g/l	K	Na	Ca	P
1	2	4	5	6	7	8
Основне середовище	—	6,0±0,3	5,1±0,1	140,0±1,3	2,34±0,1	1,31±0,07
Контроль	3	5,0±0,2	5,1±0,1	142,8±1,2	2,22±0,05	1,24±0,04
	6	3,6±0,2	5,07±0,4	141,0±1,0	2,25±0,1	1,25±0,07
	12	1,3±0,1	5,2±0,1	143,0±1,7	2,2±0,1	1,04±0,03
	24	0,1±0,03	4,8±0,2	142,0±1,7	2,32±0,08	1,1±0,1
	48	0,2±0,1	4,5±0,2	138,0±2,3	2,22±0,15	1,06±0,04
	72	0,1±0,005	5,0±0,1	141,0±0,7	2,66±0,09	1,32±0,09
Д ₁ ОС +ЕМП НВЧ 6 хв на культуру клітин	3	5,03±0,17	5,07±0,05	141,3±1,1	2,3±0,1	1,20±0,06
	6	3,6±0,04	5,27±0,2	140,0±1,3	2,24±0,07	1,27±0,1
	12	1,18±0,1	5,0±0,08	142,0±1,3	2,31±0,07	1,13±0,04
	24	0,2±0,07	4,9±0,2	144,0±1,3	2,15±0,1	0,82±0,08
	48	0,1±0,03	4,7±0,17	144,0±2,3	2,89±0,2*	1,32±0,08*
	72	0,1±0,002	5,2±0,1	142,0±1,3	2,4±0,09	1,18±0,1
Д ₂ ОС +сукцинат натрію 400мкг/см ³	3	5,13±0,07	5,2±0,2	140,3±1,1	2,4±0,1	1,22±0,03
	6	3,68±0,1	5,1±0,08	141,0±1,7	2,18±0,08	1,24±0,04
	12	0,9±0,07	5,1±0,2	142,0±1,7	2,23±0,1	1,1±0,05
	24	0,1±0,07	4,60±1,7	142,0±2,0	2,20±0,07	0,95±0,09
	48	0,15±0,003	5,0±0,17	146,0±1,3	2,66±0,1	1,04±0,06
	72	0,2±0,001	5,0±0,1	143,0±0,7	2,52±0,06	1,42±0,05
Д ₃ ОС + сукцинат натрію 400мкг/см ³ +ЕМП НВЧ 6 хв на культуру клітин	3	5,2±0,17	5,07±0,4	140,0±1,3	2,44±0,04	1,2±0,07
	6	3,4±0,1	5,1±0,16	142,0±1,3	2,27±0,09	0,92±0,08
	12	1,0±0,1	4,9±0,3	142,0±1,9	2,35±0,1	1,16±0,1
	24	0,1±0,003	4,6±1,7	142,0±1,0	2,4±0,2	1,05±0,1
	48	0,2±0,007	4,6±0,17	142,0±1,5	2,52±0,05	1,12±0,07
	72	—	5,2±0,1	141,0±0,92	2,19±0,06*	0,92±0,02*

Висновки

Дія ЕМП НВЧ впродовж 6 хвилин та сукцинату натрію в дозі 400 мкг/см³ має виражений стимулюючий вплив на проліферативну активність культури клітин яйцепроводів і ендометрію корів у порівнянні з контрольною групою. Найбільш виражений вплив ЕМП НВЧ та сукцинату натрію на проліферацію клітин ендометрію корів за сумісної дії виявлено на 72 годину культивування.

Перспективи подальших досліджень. Враховуючи позитивну дію сукцинату на проліферативну активність культури клітин яйцепроводів та ендометрію в подальшому планується з'ясувати доцільність застосування сукцинатів в поєднанні з іншими біологічно активними речовинами для корекції порушень функцій репродуктивної системи у тварин.

Yu. I. Slyvchuk, I. I. Rozgoni I. I. Hevkan V. Ja. Syrvatka

EFFECTS OF PHYSICOCHEMICAL FACTORS ON THE PROCESSES OF PROLIFERATIVE AND FUNCTIONAL ACTIVITY OF THE CULTURE OF CELLS OF BOVINE OVIDUCTS AND ENDOMETRIUM

Summary

A stimulating effect of superhigh frequency electromagnetic field and sodium succinate on the proliferation of oviduct cells of bovine endometrium, similar to the influence of growth factors

and other physical and chemical factors, has been established. It has been proved that 6 minutes long treatment of cell cultures of two types, after unfreezing and supplementation of base medium (BM) with sodium succinate in the dose of $400 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, has a pronounced stimulating effect on the proliferative activity of the culture of bovine oviduct and endometrium cells, as compared with the control group, the cells of which were cultivated in a BM containing sodium pyruvate.

Ю. И. Сливчук, И. И. Розгони, И. И. Гевкан, В. Я Сырватка

ВЛИЯНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ПРОЦЕССЫ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ СПОСОБНОСТИ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ЯЙЦЕВОДА И ЭНДОМЕТРИЯ КОРОВ

А н н о т а ц и я

Установлено стимулирующее влияние ЭМП СВЧ и сукцината натрия на пролиферацию клеток яйцеводов эндометрия коров аналогичный действия ростовых факторов и других физико-химических факторов. Доказано, что 6-минутная обработка культуры клеток двух типов после размораживания и создание основной среды (ОС) сукцината натрия в дозе $400 \text{ мкг}/\text{см}^3$ имеет выраженное стимулирующее влияние на пролиферативную активность культуры клеток яйцеводов и эндометрия коров по сравнению с контрольной группой, клетки которой культивировались в ОС из пирувата натрия.

1. Романова Л. Н. Регуляция восстановительных процессов [Текст] / Л. Н. Романова. — М. : Изд-во МГУ, 1984. — 176 с.

2. Гевкан І. І. Вплив електромагнітного поля надвисокої частоти на інтенсивність проліферації фідерних клітин [Текст] / І. І. Гевкан, А. В. Мадіч, О. В. Штапенко та ін. // Науково-технічний бюлетень Інституту біології тварин. — 2005. — Вип. 6, № 2. — С. 45–48.

3. Сливчук Ю. І. Проліферація клітин яйцепроводів корів за умов додавання до основного середовища культивування сукцинату натрію / Ю. І. Сливчук // Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини. — Харків, 2009. — Вип. 19, Ч. 2, Т 2. — С. 292–302

4. Шейкіна Н. В. Іони кальцію як первинна мішень впливу комбінованого магнітного поля на біологічні об'єкти [Текст] / Н. В. Шейкіна, В. Ф. Бондаренко Н. І. Богатіна. // Медична хімія. — Тернопіль, 2008. — Т. 10 (1), № 2. — С. 5–9.

5. Гевкан І. І. Вплив ростових факторів та електромагнітного поля надвисоких частот на проліферативну активність культури клітин яйцепроводів корів [Текст] / І. І. Гевкан, Ю. І. Сливчук // Науково-технічний бюлетень Інституту тваринництва. — Харків, 2008. — № 90. — С. 94–103.

6. Маевский Е. И. Анаэробное образование сукцината и облегчение его окисления - возможные механизмы адаптации клетки к кислородному голоданию / Е. И. Маевский, Е. В. Гришина., А. С. Розенфельд та ін. // Биофизика. — 2000. — Т. 45, № 3. — С. 509–513.

7. Янтарная кислота в медицине, пищевой промышленности, сельском хозяйстве : сб. научн. Статей / Под. ред. М. Н. Кондрашовой, Ю. Г. Каминского, Е. И. Маевского. — Пушкино, 1996. — 230 с.

Рецензент: провідний науковий співробітник лабораторії фізіології і патології відтворення, кандидат біологічних наук, с. н. с. Андрушко О. Б.