

WPŁYW HORMONU LUTEINIZUJĄCEGO (LH), PROLAKTYNY (PRL) I hCG
NA SEKRECJĘ ESTRADIOLU 17β PRZEZ KOMÓRKI LUTEALNE ŚWIN
Z WCZESNEGO OKRESU CIĄŻY

Jadwiga Przała, Teresa Więsak, Anna Grażul

Instytut Fizjologii Zwierząt,
Akademia Rolniczo-Techniczna, Olsztyn - Kortowo

WSTĘP

Uwalnianie estradiolu 17β przez ciała żółte ciążowe świń było wcześniej badane przez Lemon i Loir [8] oraz przez Watsona i Patka [15]. Lemon i Loir [8] stwierdzili, że komórki lutealne duże oraz komórki małe do 30 dnia ciąży nie uwalniają dających się oznaczyć ilości estradiolu 17β . Dopiero od 30 dnia ciąży stopniowo narasta sekrecja tego sterydu. Autorzy ci wykazali także, że uwalnianie estradiolu przez duże komórki lutealne po 30 dniu ciąży jest znacznie wyższe niż przez komórki małe. Natomiast Watson i Patek [15] stwierdzili, że ciała żółte świń już w 16-22 dniu ciąży wydzielają estradiol.

Z kolei Perry i wsp. [10] wykryli, że blastocysty świń rozpoczynają wytwarzanie estrogenów od 12 dnia ciąży, a około 16-17 dnia post coitum pojawiają się one we krwi krążącej w postaci nieaktywnego siarczanu estronu [13, 14], osiągając szczytowe wartości w 26-29 dniu ciąży.

W dostępnym piśmiennictwie nie spotkaliśmy prac, w których badano by wpływ hormonów przysadki i hGG na wydzielanie estrogenów przez ciała żółte uzyskane od świń ciężarnych, w związku z czym uważaliśmy za celowe prześledzenie ich roli w sekrecji komórek lutealnych. Za najbardziej optymalny okres do badań przyjęto 18 dzień ciąży, w którym estrogeny, wytwarzane przez blastocysty płodu, zaczynają oddziaływać na układ rozrodczy matki.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na komórkach lutealnych uzyskanych z ciałek żółtych pięciu loch w 18 dniu ciąży. W dniu tym zwierzęta zabijano, pobierano jajniki i umieszczano je w zbuforowanym roztworze soli fizjologicznej (PBS produkcji Wytwórni Surowic i Szczepionek w Lublinie) w temp. 4°C z dodatkiem 50 j.m./ml penicyliny i 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycyny.

Z jajników izolowano ciałka żółte, które cięto na skrawki i poddawano działaniu 0,25% roztworu trypsyny (Wytwórnia Surowic i Szczepionek w Lublinie). Pierwsza inkubacja skrawków ciałek żółtych z enzymem trwała od 10 do 15 minut w temp. $37-38^{\circ}\text{C}$. Nadsącz z pojedynczymi komórkami zlewano i wirowano w ciągu 5 minut przy $300 \times g$ w temp. 4°C . Do niestrawionych skrawków ponownie dodawano roztwór enzymu i inkubowano około 7-10 min. Otrzymany nadsącz zlewano i wirowano jak poprzednio. Czynność tę powtórzono trzeci raz, przy czym ostatnia inkubacja w roztworze enzymu trwała około 5 min. Uzyskane komórki płukano dwukrotnie płynem Eagle'a (Wytwórnia Surowic i Szczepionek w Lublinie) i po odwirowaniu zawieszano w pożywce składającej się z płynu Eagle'a i albuminy ludzkiej, dodanej w ilości 2% oraz uzupełnionej 50 j.m./ml penicyliny i 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycyny.

Zawiesinę komórek w koncentracji $5 \times 10^4/\text{ml}$ pożywki inkubowano w probówkach Leightona w temp. 37°C przez 6 godzin.

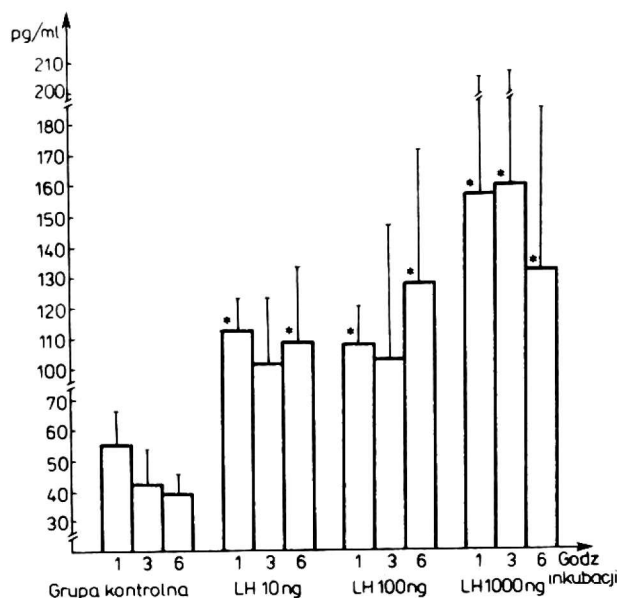
Próby po ustawieniu w termostacie poddawano półgodzinnej stabilizacji, a następnie dodawano LH (LH-GPZ-1 uzyskany w Instytucie Fizjologii i Biochemii Zwierząt o aktywności odpowiadającej 0,63-NIH-LH S1), PRL (KK-2 o aktywności 32 j.m./mg oczyszczonej w Instytucie Fizjologii i Żywienia Zwierząt PAN w Jabłonce lub hCG - produkcji Wytwórni Surowic i Szczepionek w Lublinie pod nazwą handlową Biogonadyl). Hormony LH i PRL dodawano do pożywki w koncentracji 10, 100 i 1000 ng/ml, natomiast hCG w koncentracji 1, 5 i 10 I.U./ml. Grupę kontrolną stanowiły próby inkubowane bez dodatku hormonów.

Zawartość estradiolu 17β oznaczano po upływie 1, 3 i 6 godzin inkubacji metodą radioimmunologiczną wg Hotchkissa i wsp. [6]. Estradiol o aktywności 93 Ci/mmol ($2, 4, 6, 7\text{-H}^3$ estradiol) otrzymano z firmy Amersham - Anglia. Przeciwciała antyestradiolowe 17β otrzymano od Profesora Romana Rembiesy z Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie. Dodatkowe dane dotyczące metody podano w pracy Przała i wsp. [12]. Istotność różnic między poziomem estradiolu 17β w badanych grupach wykonano, stosując analizę wariancji i test Duncana.

WYNIKI

Wpływ LH na sekrecję estradiolu 17β

Stwierdzono, że LH w dawkach 10, 100 i 1000 ng/ml pożywki zwiększa sekrecję estradiolu 17β przez komórki lutealne świń z 18 dnia ciąży w porównaniu z grupą kontrolną (rys. 1).

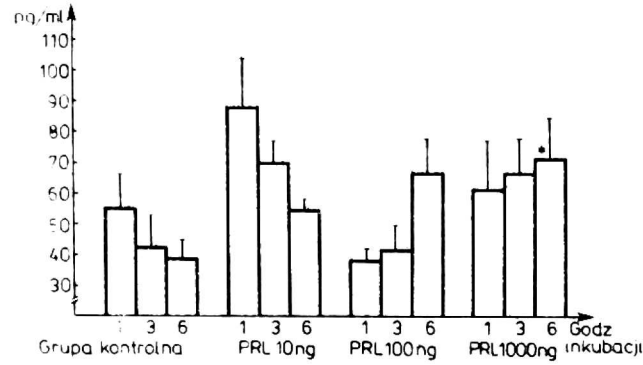


Rys. 1. Wpływ LH na sekrecję estradiolu 17β przez komórki lutealne świń z 18 dnia ciąży. Wartości średnie \pm SEM ($n = 5$), * - różnica statystycznie istotna ($P < 0,05$)

Różnice statystycznie istotne ($P < 0,05$) uzyskano dla dawki 10 i 100 ng/ml po 1 i 6 godzinach inkubacji, a dla dawki 1000 ng we wszystkich godzinach doświadczenia. Jednocześnie zaobserwowano, że dziesięciokrotne zwiększenie koncentracji LH z 10 do 100 ng/ml nie spowodowało proporcjonalnego wzrostu w poziomie sekrecji estradiolu 17β po 1 i 3 godzinach inkubacji, dopiero po 6 godzinach doświadczenia wystąpił wzrost sekrecji tego sterydu. Uzyskane wartości kształtowały się odpowiednio 112,3 \pm 9,6; 100,8 \pm 22,2 i 107,4 \pm 25,0 ng/ml przy dawce 10 ng/ml, a 107,4 \pm 12,2; 102,2 \pm 43,2 i 127,4 \pm 44,3 przy dawce 100 ng/ml pożywki w 1, 3 i 6 godzinie inkubacji. Natomiast największy wpływ miał LH w koncentracji 1000 ng/ml, przy której poziom estradiolu wynosił odpowiednio 156,1 \pm 47,1; 158,6 \pm 47,4 i 131,1 \pm 52,3 w 1, 3 i 6 godzinie inkubacji wobec 55,2 \pm 11,4; 41,7 \pm 11,2 i 39,1 \pm 6,1 pg/ml dla grupy kontrolnej.

Wpływ PRL na sekrecję estradiolu 17β

Efekt prolaktyny w koncentracji 10, 100 i 1000 ng/ml pożywki na sekrecję estradiolu przez komórki lutealne świń z 18 dnia ciąży przedstawiono na rysunku 2. Stwierdzono, że PRL w dawce 10 ng/ml nie miała istotnego wpływu na przebieg sekrecji estradiolu 17β .



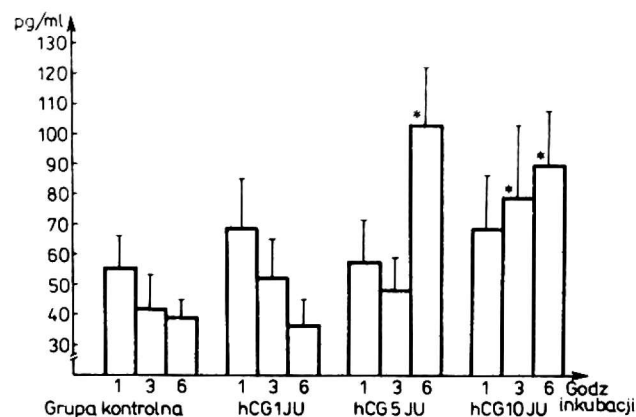
Rys. 2. Wpływ PRL na sekrecję estradiolu 17β przez komórki lutealne świń z 18 dnia ciąży. Wartości średnie \pm SEM (n = 5)
* - różnica statystycznie istotna (P < 0,05)

Jakkolwiek była pewna tendencja do wzrostu poziomu tego sterydu, wartości dla 1, 3 i 6 godziny inkubacji wynosiły odpowiednio $87,8 \pm 15,3$; $70,1 \pm 7,2$ i $54,2 \pm 3,4$ wobec $55,2 \pm 11,4$; $41,7 \pm 11,22$ i $39,1 \pm 6,1$ pg/ml dla grupy kontrolnej.

Prolaktyna w dawce 100 ng/ml pożywki także nie powodowała istotnych zmian w sekrecji estradiolu 17β . Dawka 1000 ng/ml pożywki nie spowodowała również istotnych zmian w tempie sekrecji tego sterydu po 1 i 3 godzinach inkubacji, dopiero po 6 godzinach stwierdzono statystycznie istotny (P < 0,05) wzrost sekrecji estradiolu 17β (wynosił on $71,2 \pm 12,5$ pg/ml wobec $39,1 \pm 6,1$ pg/ml dla grupy kontrolnej).

Wpływ hCG na sekrecję estradiolu 17β

Wykazano, że dodanie hCG w ilości 1 I.U./ml pożywki nie miało istotnego wpływu na przebieg sekrecji estradiolu 17β (rys. 3).



Rys. 3. Wpływ hCG na sekrecję estradiolu 17β przez komórki lutealne świń z 18 dnia ciąży. Wartości średnie \pm SEM (n = 5), * - różnica statystycznie istotna (P < 0,05)

Podobnie dawka 5 I.U./ml nie miała wpływu na tempo sekrecji tego sterydu po 1 i 3 godzinach inkubacji, dopiero po 6 godzinach doświadczenia wykazano statystycznie istotny ($P < 0,05$) wzrost poziomu estradiolu, wynoszący $101,9 \pm 19,5$ pg/ml wobec $39,1 \pm 6,1$ pg/ml dla grupy kontrolnej. HCG w dawce 10 I.U./ml pożywki miał największy wpływ na tempo sekrecji estradiolu, ponieważ różnice statystycznie istotne ($P < 0,05$) wykazano po 3 i 6 godzinach doświadczenia. Różnice te wynosiły odpowiednio $76,7 \pm 24,3$ i $68,8 \pm 18,0$ pg/ml w 3 i 6 godzinie doświadczenia wobec $41,7 \pm 11,2$ pg/ml i $39,1 \pm 6,1$ dla grupy kontrolnej.

DYSKUSJA

Uzyskane przez nas stymulujące działanie LH oraz niektórych spośród stosowanych dawek hCG na sekrecję estradiolu 17β przez komórki lutealne świń z 18 dnia ciąży sugeruje, że sekrecja tego sterydu nie jest maksymalna i może być modulowana przez hormony egzogenne.

Z dotychczasowych badań przeprowadzonych nad sekrecją progesteronu przez komórki lutealne świń z 30, 60 i 90 dnia ciąży przez Lemon i Loir [8] wiadomo, że zarówno komórki małe jak i duże reagują na LH i że reaktywność ta zmniejsza się wraz z zaawansowaniem ciąży. Najsilniej reagowały na LH komórki z 30 dnia ciąży, słabiej z 60 i naj słabiej z 90 dnia ciąży. Autorzy ci zaobserwowali także interesującą zależność obniżania produkcji progesteronu przez komórki lutealne w miarę narastania ciąży i towarzyszący temu wzrost ilości uwalnianego estradiolu 17β , którego sekrecja kształtowała się odpowiednio: $9,6$ pg/godz/ 10^5 komórek w 57 dniu, w porównaniu z $108,3$ pg w 94 dniu ciąży [8].

Z badań przeprowadzonych przez Gregoraszcuk [4] wynika, że odpowiedź komórek lutealnych, pochodzących z ciałek cyklicznych, na LH i hCG zmienia się w zależności od wieku ciałka żółtego. Sekrecja estradiolu przez komórki lutealne świń z fazy wczesnolutealnej była hamowana przez LH i hCG. Natomiast w fazie środkowlutealnej LH nie miał wpływu na wydzielanie estradiolu, a hCG istotnie pobudzał sekrecję tego hormonu. W przedstawionych badaniach wykazaliśmy, że LH spośród innych stosowanych hormonów miał pobudzający wpływ na sekrecję estradiolu przez komórki lutealne pochodzące z ciałek ciążowych. Z drugiej strony wiadomo, że w przeciwieństwie do krowiego [5] oraz owczego ciałka żółtego [1] ciałko żółte ciężarnej świni [8] oraz szczura [3] charakteryzuje się wysoką zdolnością aromatyzowania androgenów. Można wobec tego przypuszczać, że w ciałku żółtym ciążowym świni LH i wysokie dawki hCG stymulują proces aromatyzacji testosteronu do estradiolu, bądź że wzrost sekrecji estradiolu odbywa się przez zwiększoną biosyntezę androgenów, indukowaną przez LH i hCG, jak wykazał to u szczurów Mogoffin i Erikson [9].

Z dotychczasowych badań nad wpływem prolaktyny na sekrecję estrogenów przez ciało żółte cykliczne wiadomo, że hormon ten hamuje sekrecję estrogenów zarówno we wczesnej jak i środkowej fazie lutealnej [4, 11]. Wykazano, że PRL hamuje aktywność 20α -hydroksysteroidowej dehydrogenazy, w związku z czym hamowany jest katabolizm progesteronu, co w efekcie prowadzi do obniżenia poziomu estrogenów [2, 7, 16]. Ciekawy więc wydaje się fakt wzrostu poziomu estradiolu 17β po inkubacji komórek lutealnych z ciałek żółtych ciążowych z wysoką dawką PRL 1000 ng/ml. Prawdopodobnie jest to związane z uruchomieniem dodatkowych mechanizmów regulujących funkcję endokrynną ciałek żółtych ciążowych.

LITERATURA

1. Baird D.F., Scaramuzzi R.J.: The source of ovarian oestradiol and androstendione in the sheep during the luteal phase. *Acta Endocrinologica*, 1976, 83, 402-409.
2. De La Llosa-Hermier M.P., Leboulleux P., Evrard M., Hermier C.: In vitro effect of prolactin, prostaglandin $F_{2\alpha}$ and cycloheximide on 20α -dihydroprogesterone synthesis in pseudo-pregnant rat ovaries. *J. Steroid Biochem.* 1979, 10, 689-693.
3. Elbaum D.J., Keyes P.L.: Synthesis of 17 beta estradiol by isolated ovarian tissues of the pregnant: aromatization in the corpus luteum. *Endocrinology*, 1979, 99, 573-579.
4. Gregoraszczyk E.: Steroid hormone release in cultures of pig corpus luteum and granulosa cells: Effect of LH, hCG, PRL and estradiol: *Endocrinologia Experimentalis*, 1983, 17, 59-68.
5. Henderson K.M., Moor Y.S.: Androgen aromatization by luteinized granulosa cells and corpora lutea in vitro: Eleventh Annual Meeting Society for the Study of Reproduction, August 8-10, Southern Illinois University Carbondale, Illinois, Abst. 1978, 71.
6. Hotchkis J., Atkinson L.E., Knobil E.: Time course of serum estrogen and luteinizing hormone (LH) concentration during the menstrual cycle of the Rhesus Monkey. *Endocrinology*, 1971, 89, 177-183.
7. Lahav M., Lamprecht S.A., Amsterdam A., Lindner H.R.: Suppression of 20α -hydroxysteroid dehydrogenase activity in cultured rat luteal cells by prolactin. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1977, 6, 293-299.
8. Lemon M., Loir M.: Steroid release in vitro by two luteal cell types in the corpus luteum of the pregnant sow. *J. Endocrinol.*, 1977, 72, 351-359.
9. Magoffin D.A., Erickson G.F.: LH induction of androgen biosynthesis in cultured ovarian cells: Inhibitory effect of prolactin. In *Dynamics of ovarian function*. Ed. B. Schwartz, Hunzicker-Dunn, New York, 1981, 55-60.

10. Perry J.S., Heep R.B., Burton R.D., Gadsby: Endocrinology of the blastocyst and its role in the establishment of pregnancy. *J. Reprod. Fert.*, 1976, 25-85-104.
11. Przała J., Więsak T., Grażul A., Ciepłińska E.: The effect of prolactin on estradiol 17β and testosterone plus 5α - dihydrotestosterone secretion by porcine luteal cells in vitro. *Endocrinologie*, w druku, 1983.
12. Przała J., Grażul A., Więsak T.: Wpływ oksytocyny na komórki lutealne świń z wczesnego okresu ciąży. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.*, w druku, 1983.
13. Robertson H.A., King G.J.: Plasma concentrations of progesterone, oestrone, oestradiol 17β and of oestrone sulphate in the pig at implantation during pregnancy and at parturition. *J. Reprod. Fert.* 1974, 40, 133-141.
14. Robertson H.A., King G.J., Dyck G.W.: The appearance of oestrone sulphate in the peripheral plasma of the pig in early pregnancy. *J. Reprod. Fert.*, 1978, 52, 337-338.
15. Watson J., Patek C.E.: Steroid and prostaglandin and embryos of cyclic and pregnant pigs. *J. Endocr.* 1979, 82, 425-428.
16. Wiest W.G., Ridwell W.R., Balogh K.: Progesterone catabolism in the rat ovary a regulatory mechanism for progestational potency during pregnancy. *Endocrinology*, 1968, 82, 844-859.

J. Przała, T. Więsak, A. Grażul

INFLUENCE OF LUTEINIZING HORMONE LH, PROLACTIN PRL AND hCG ON ESTRADIOL 17β SECRETION BY LUTEAL CELLS FROM EARLY PREGNANT SOWS

Summary

The present study was conducted to examine the effect of LH, PRL and hGG on estradiol 17β secretion by luteal cells from 18th day pregnant pigs. Trypsin-dispersed luteal cells were suspended in Eagle's medium + 2% human serum albumin in concentration of 5×10^4 cells/ml of medium. Suspensions were incubated during 6 hours with or without LH, PRL (doses: 10, 100, 1000 ng/ml) and hGG (doses: 1, 5, 10 I.U./ml). The level of estradiol 17β was estimated after first, 3th and 6th hours of incubation. The results showed, that LH stimulated estradiol 17β release. Greatest effect was observed after using 1000 ng LH/ml medium. Small doses of prolactin (10 and 100 ng/ml medium) had no effect on estradiol 17β secretion, only dose of 1000 ng PRL/ml stimulated estradiol 17β secretion, after 6 hours of incubation ($P < 0,05$).

hCG (dose 1 I.U./ml) had no influence on estradiol 17β release too. However 5 I.U. hCG/ml stimulated secretion of this steroid after 6 hours of incubation, whereas 10 I.U. hCG/ml stimulated after 3 and 6 hours ($P < 0,05$).

These results demonstrate, that estradiol 17β secretion by luteal cells from early pregnant sows could be regulated by exogenous hormones and the effect of this action was dependent on doses of hormones.

Я.Пшала, Т.Венсак, А.Гражуль

ВЛИЯНИЕ ЛУТЕИНИЗИРУЮЩЕГО ГОРМОНА ЛН , ПРОЛАКТИНА PRL
И hCG НА СЕКРЕЦИЮ ЭСТРАДИОЛА 17β ЛУТЕАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ
СВИНЕЙ В РАННЕМ ПЕРИОДЕ БЕРЕМЕННОСТИ

Р е з ю м е

На 18 день беременности у свиней вырезали яичники, изолировали жёлтые тела и подвергали их воздействию 0,25% раствора трипсина, чтобы получить отдельные лютеальные клетки. Изолированные клетки помещали в питательной среде, содержащей жидкость Eagle`а с добавкой 2% человеческого альбумина. Полученную суспензию инкубировали в темп. 37°C в течение 6 часов с добавкой или без ЛН, PRL и hCG. Гормон ЛН и PRL добавляли в концентрации 10, 100 и 1000 нг/мл питательной среды, а hCG в концентрации 1, 5 и 10 м.е./мл. Уровень эстрадиола 17β определяли радиоиммунологическим методом по истечении 1, 3 и 6 часов инкубации.

Констатировали, что ЛН стимулирует секрецию эстрадиола лютеальными клетками свиней, взятыми на 18 день беременности. Наибольшее стимулирующее влияние наблюдалось при концентрации ЛН 1000 нг/мл питательной среды (статистически значимую разницу $p < 0,05$ констатировали по истечении 1, 3 и 6 часов опыта).

Пролактин в малых дозах 10 и 100 нг/мл не оказывал влияния на темп секреции эстрадиола; только доза 1000 нг/мл питательной среды стимулировала секрецию этого гормона после 6 часов инкубации. Также hCG в дозе 1 м.е./мл питательной среды не оказывал влияния на секрецию эстрадиола, в то время как доза 5 м.е./мл стимулировала секрецию после 6 часов инкубации,

а 10 м.е./мл - после 3 и 6 часов опыта.

Полученные результаты показали, что секреция эстрадиола лютеальными клетками свиней, взятыми в раннем периоде беременности, может быть регулирована экзогенными гормонами и что эффективность воздействия зависит от концентрации гормона в питательной среде.