

## WRAŻLIWOŚĆ NA GONADOTROPINY IZOLOWANYCH PĘCHERZYKÓW I KOMÓREK JAJNIKA

*Stanisława Stokłosowa, Anna Stadnicka*

Zakład Fizjologii Zwierząt, Instytut Zoologii UJ, Kraków  
Kierownik Zakładu: prof. dr Adam Kulczycki

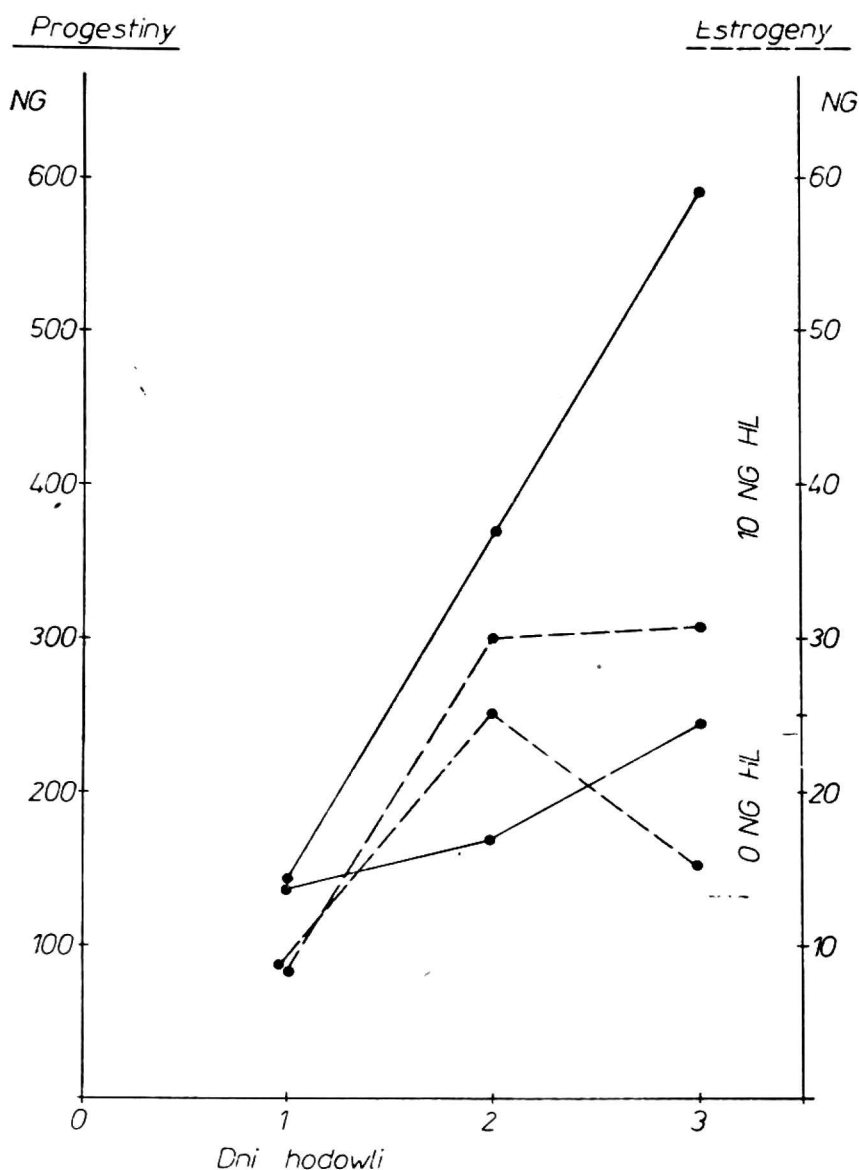
Jajnik jest gruczołem dokrewnym o bardzo złożonej budowie i funkcji, nic więc dziwnego, że wielokrotnie ponawiano próby izolowania i badania poszczególnych jego komponent. Tak np. izolowany pęcherzyk jajnikowy jest bardzo dobrym modelem badań jego wyłącznej funkcji hormonalnej, wolnej od wpływów złożonego środowiska, panującego w całym gruczole. Pęcherzyki jajnikowe wcześniej izolowali: Kullander [5], Gospodarowicz [2], Grob [1], Stokłosowa i Nalbandov [6], a następnie inkubowali je lub hodowali z różnym powodzeniem.

W przedstawionej pracy izolowane manualnie pęcherzyki szczura hodowano metodą organotypową, z zachowaniem ich charakterystycznej struktury. Dojrzałe pęcherzyki eksplantowano wówczas, gdy rozmaz pochwoy wykazywał stadium estrus, po czym hodowano je uproszczoną metodą Trowella [7] na granicy 2 faz: pożywki płynnej T8 oraz mieszaniny tlenu i dwutlenku węgla w stosunku 95 : 5 procent. Pęcherzyki przeżywały zwykle 3 dni w hodowli.

Oprócz hodowli kontrolnych prowadzono hodowle z dodatkiem hormonu luteinizującego (w ilości 10 ng na 1 ml pożywki płynnej). Obecność progesteronu 20  $\alpha$ -hydroksy-4, pregnen-3-onu i estradiolu w jajnikach i izolowanych pęcherzykach wykazano metodą chromatografii cienkowarstwowej i gazowej.

Ilość hormonów wydzielonych przez pęcherzyki do pożywki oznaczano metodą radiokompetycyjną — progestiny [4] i radioimmunochemiczną — estrogeny [3]. Na rysunku 1 przedstawiono kształtowanie się w pożywkach poziomu progestin i estradiolu w ciągu 3-dniowej inkubacji pęcherzyków z dodatkiem i bez hormonu luteinizującego. Dane odnoszą się do wartości średnich dla jednej szalki Petriego.

Najwyższe wartości wykazywały hormony w ciągu pierwszego dnia



Wpływ hormonu luteinizującego na produkcję izolowanych pęcherzyków jajnikowych hodowanych *in vitro*. Dawka hormonu wynosiła 10 ng na jedną hodowlę.  
The effect of 10 ng LH per culture on the hormonal activity of isolated rat ovarian follicles in organ culture

hodowli. Ilość progestin wynosiła ok. 140 ng na hodowlę, w drugim dniu przyrost był znacznie mniejszy, bo tylko 23 ng, lecz w trzecim dniu ponownie wzrastał do ok. 80 ng na jedną hodowlę. Inaczej kształtował się poziom estradiolu w pożywce. Tu obserwowano znaczny wzrost syntezy w ciągu pierwszego i drugiego dnia hodowli, a w ciągu trzeciego — wyraźny spadek. Dodanie hormonu luteinizującego do pożywki silnie stymulowało w hodowanych pęcherzykach syntezę progestagenów. Pęcherzyki właściwie luteinizowały hormonalnie, bowiem ilość wydzielonych hormonów codziennie niemal się podwajała. Natomiast wartości estrogenów w pierwszym i drugim dniu hodowli niewiele różniły się od wartości w hodowlach nie stymulowanych. W trzecim dniu hodowli LH zapobiegał spadkowi syntezy estrogenów. Ich ilość utrzymywała się na poziomie zbliżonym do drugiego dnia hodowli.

Jeżeli porównamy ilość estrogenów w jajniku i izolowanych pęcherzykach nie hodowanych (tab. 1-2), wówczas zwrócimy uwagę na fakt, że poziom estrogenów w przebiegu proestrusa — najwyższy w ca-

Tabela 1

Poziom estrogenów (w pg/pęcherzyk) w pęcherzykach jajnikowych szczura w różnych godzinach proestrusa, po owulacji (PO), w metestrus (M) i diestrus (D)

Estrogen levels in rat ovarian follicles during proestrus, after ovulation (PO) in metestrus (M) and diestrus (D)

	Proestrus					PO	M	D
Godziny	7	10	13	18	20	po owulacji		
Pęcherzyki duże	320 >	320 >	320 >	320	20,5			
Pęcherzyki małe	0	0	3	62	0	2,1	5,8	13

łym cyklu płciowym (kształtujący się u szczura na poziomie ok. 370 pg na 1 pęcherzyk) — jest 2-8 razy niższy niż ilość wydzielonych estrogenów przez pęcherzyk do pożywki (1000-2500 pg). Niestety, brak jest jeszcze danych dotyczących poziomu progestagenów. Z wstępnych badań wiadomo, że pęcherzyk w stadium proestrusa zawierał ok. 6 ng tych hormonów, a więc znacznie mniej niż wydzielał pęcherzyk hodowany.

Tabela 2

Poziom estrogenów w jajniku szczura w różnym wieku (48, 56 i 72 godziny po wstrzyknięciu PMS, po owulacji, w metestrus i diestrus)

Estrogen levels in ovaries in different stages of development, after treatment with 30 i. u. of PMS (48, 56 and 72 hours after the injection of the hormone, after ovulation and finally in metestrus and diestrus)

	Ilość estrogenów w pg/mg tkanki jajnika		
Szczur 22-dniowy	7,1		
Szczur 29-dniowy	19,3		
Godziny iniekcji	48	56	72
	42	70,5	177
Po owulacji	1,9		
Metestrus	5,3		
Diestrus	22,7		

Porównując ilości estrogenów wytwarzanych w jajniku niedojrzałym, stymulowanym egzogennym PMS, obserwujemy również niższy poziom tych hormonów niż w hodowli, chociaż PMS powinno być bardziej efektywnym czynnikiem estrogenym niż LH.

Najwidoczniej *in vitro* brak jest czynników regulujących syntezę hormonów sterydowych, działających *in vivo*. Wynika więc wniosek, że w pęcherzykach hodowanych może przebiegać bardziej intensywny poziom przemian.

W izolowanych komórkach granulozy i osłonki wewnętrznej krowy i świni, hodowanych jako oddzielne monolayers w pożywce z dodatkiem egzogennych FSH i LH, obserwowano również reakcję w postaci zmiany aktywności histochemicznie wykrywalnych enzymów sterydogenezy. I tak np. LH stymulował aktywność dehydrogenazy 20 $\alpha$ -hydroksy sterydowej i glukozo-6-fosforanowej, natomiast FSH stymulował mitozy, wzmacniał syntezę lipidów i cholesterolu w hodowanych komórkach.

Badania te są w toku i przedstawione tu dane mają charakter początkowy.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Grob H. S.: Biology Reprod., 1, 320, 1969.
2. Gospodarowicz D.: Acta Endocr. 47, 293, 1964.
3. Hotchkiss J., Atkinson L. E., Knobil E.: Endocrinology, 89, 177, 1971.
4. Johannson E. D. B., Naill J. D., Knobil E.: Endocrinology, 82, 143, 1968.
5. Kullander S.: Acta Endocr. 38, 598, 1961.
6. Stokłosowa S., Nalbandov A. V.: Endocrinology, 91, 25, 1972.
7. Trowell O. A.: Expl. Cell Res 16, 118, 1959.

Станислава Стоклосова, Анна Стадницка

#### ВОСПРИИМЧИВОСТЬ К ГОНАДОТРОПАМ ИЗОЛИРОВАННЫХ ФОЛЛИКУЛ И КЛЕТОК ЯИЧНИКА

##### Резюме

Изолированные фолликулы яичника крысы культивировались органотипным методом. К культуре добавляли 10 нг. LH на 1 культуру. Фолликулы подвергались лютеинизации, выделяя увеличенное количество прогестона. Сравнивалось количество эстрогенов в культурах с количеством их в некультивированных фолликулах и яичниках на разных стадиях цикла. Более высокий уровень эстрогенов в культивированных фолликулах является результатом отсутствия тормозящих факторов *in vitro*.

*Stanisława Stokłosowa, Anna Stadnicka*

GONADOTROPHINS AND THE REACTIVITY *IN VITRO*  
OF ISOLATED RAT OVARIAN FOLLICLES AND CELLS

S u m m a r y

Isolated rat ovarian follicles were cultured as organ culture and isolated cells as monolayers. Follicles grown in the medium containing 10 ng LH showed elevated estrogen and progestin levels. Cultured tissue was able to produce more hormones than ovaries *in vivo* were. It was due to the lack *in vitro* of other factors regulating hormone synthesis *in vivo*.

*Dr hab. Stanisława Stokłosowa*  
*Wydział Biologii i Nauk o Ziemi UJ*  
*Instytut Zoologii*  
*Zakład Fizjologii Zwierząt*  
*30-060 Kraków, ul. Krupnicza 50*