

MECHANIZM WIĄZANIA TESTOSTERONU
PRZEZ OBSZAR SZYPUŁY NACZYNIOWEJ JAJNIKA I MACICE

Stanisława Stefańczyk

Instytut Fizjologii Zwierząt
Akademia Rolniczo-Techniczna, Olsztyn - Kortowo

WSTĘP

Testosteron przenika z żyły do tętnicy jajnikowej u świń nie tylko na drodze bezpośredniego przechodzenia cząstek przez ścianki naczyń, lecz także za pośrednictwem płynu tkankowego i limfy oraz naczyń włosowatych obszaru szypuły naczyniowej jajnika [7]. Tkanki tego obszaru wykazują zdolność do zatrzymywania znacznych ilości radioaktywnego testosteronu, infundowanego do żyły jajnikowej [6, 8].

Powyższe fakty nasuwają przypuszczenie o możliwości przejściowego gromadzenia testosteronu odpływającego z jajnika z płynem tkankowym i limfą przez tkanki obszaru szypuły naczyniowej jajnika, bądź też udziału testosteronu w regulacji cyklu płciowego. W niniejszej pracy postanowiono zbadać sposób zatrzymywania testosteronu w obszarze szypuły naczyniowej jajnika i porównać go z wiązaniem, któremu podlega ten hormon w tkankach macicy, oraz prześledzić dynamikę zatrzymywania testosteronu w tkankach obszaru szypuły naczyniowej jajnika.

MATERIAŁ I METODY

Zwierzęta doświadczalne

Doświadczenie wykonano na 26 lochach rasy WBP w 17 dniu cyklu płciowego, podzielonych na dwie grupy. W I grupie było 15 loch po drugim oproszeniu, u których oznaczono wiązanie

^3H -testosteronu przez tkanki obszaru szypuły naczyniowej jajnika. W II grupie było 11 loszek dojrzałych płciowo, u których oznaczano receptory cytozolowe dla testosteronu w tkankach macicy i więzadła szerokiego.

Oznaczanie wiązania ^3H -testosteronu przez tkanki obszaru szypuły naczyniowej

Przygotowanie jajników izolowanych wraz z obszarem szypuły naczyniowej oraz infuzję ^3H -testosteronu do żyły jajnikowej 2 cm poniżej jajnika wykonano zgodnie z metodą opisywaną wcześniej [8]. Po zakończeniu infuzji ^3H -testosteronu w naczyniach obszaru szypuły naczyniowej utrzymywano jeszcze w ciągu 30 minut krążenie krwi, a następnie również w ciągu 30 minut krążenie dekstranu (Dextran 70 000, Polfa Kutno). Krew lub dekstran wypływające z żyły jajnikowej, 20 cm poniżej jajnika, podczas kolejnych 5-minutowych etapów doświadczenia umieszczano w łaźni lodowej, a następnie wirowano przy 3000 obr/min w wirówce K-70 (Janetzki). Z obszaru szypuły naczyniowej jajnika pobierano wycinki tkanek wraz z rozgałęzieniami tętnicy jajnikowej i żyłą jajnikową i zamrażano w ciekłym azocie.

Uzyskiwanie frakcji cytozolowej i jądrowej z pobranych tkanek

Zamrożone tkanki rozcierano w porcelanowym moździerz. Homogenety mieszano z buforem (50 mM tris HCl, pH 7,4 1 mM EDTA) w proporcji 2 : 1 i wirowano w wirówce K-70 przy 800 g w ciągu 10 minut. Nadsącz wirowano 60 minut w wirówce VAC-602 (Janetzki) przy 105 000 g w celu uzyskania cytozolu. Frakcję jądrową oczyszczano oraz ekstrahowano z niej ^3H -testosteron zgodnie z metodą opisaną przez Giannopoulosa [4].

Oznaczanie wiązania ^3H -testosteronu w cytozolu

W cytozolu oznaczano radioaktywność całkowitą (^3H -testosteron wolny + związany) oraz radioaktywność związaną po adsorbcji wolnego hormonu na węglu opłaszczonym dekstranem. Masę cząsteczkową białek cytozolowych wiążących testosteron określano metodą analizy w liniowym gradiencie stężeń sacharozy (5-20%), stosując jako wzorzec roztwór albuminy surowicy wołowej. Próby wirowano w roztworze SW 41 wirówki LS-40 (Beckman) w ciągu 10 godzin. Po odwirowaniu z dna próbek pobierano frakcje o objętości 12 kropli, w których mierzono stężenie białka w spektrofotometrze VSU-2 (Zeiss). Radioaktywność frakcji, mierzono w liczniku LS-7500 Beckman o wydajności dla trytu 70%, po dodaniu 10 ml scyntylatora dioksanowego.

Oznaczanie radioaktywności osocza, dekstranu, cytozolu i ekstraktu jądrowego

Próbki osocza, dekstranu, cytozolu i ekstraktu jądrowego, o objętości 0,5 ml każda, ekstrahowano 20-krotną objętością eteru etylowego. Radioaktywność prób mierzono w liczniku LS-7500. Wydajność ekstrakcji wynosiła: dla osocza i cytozolu $85 \pm 1,9\%$, dla ekstraktu jądrowego $90 \pm 1,5\%$, dla dekstranu $92 \pm 1,5\%$.

Identyfikacja testosteronu

Identyfikację testosteronu znakowanego trytem, związanego przez tkanki obszaru szypuły naczyniowej jajnika, wykonano w sposób przedstawiony przez Krzymowskiego i wsp. [8].

Oznaczanie receptorów cytozolowych dla testosteronu

Loszki II grupy porażano prądem i skrwawiano. Natychmiast po skrwawieniu pobierano macicę wraz z więzadłem szerokim i skrawek przepony. Następnie wykonywano perfuzję rogu macicy schłodzonym buforem (0,05 M tris HCl, pH 7,4) przez tętnicę maciczną po lewej stronie. Z wyptukanego rogu macicy pobierano próbki błony śluzowej i mięśniowej macicy, wycinek obszaru szypuły naczyniowej jajnika z rozgałęzzeniami tętnicy jajnikowej i żyłą jajnikową oraz więzadła szerokiego z okolicy szyjki macicy. Pobrane tkanki zamrażano w ciekłym azocie, a następnie homogenizowano i wirowano w temperaturze 0°C przy 800 g w ciągu 10 minut. Uzyskany nadsącz używano do oznaczania receptorów cytozolowych. Oznaczenie przeprowadzano według metody Castanedy i Liao [2], używając do adsorpcji nie związanego testosteronu węgla opłaszczanego dekstranem. Stężenie białka w nadsączu oznaczono metodą Lowry i wsp. [9].

Pojemność wiązania całkowitego, niespecyficznego i specyficznego dla poszczególnych tkanek wyliczono w stosunku do 1 mg białka. Uzyskane wartości wiązania specyficznego poddano analizie metodą Scatcharda, wyznaczając stałą dysocjacji kompleksu hormon-receptor (K_D) oraz pojemność wiązania receptorowego (N_s).

Oznaczanie specyficzności hormonalnej receptorów

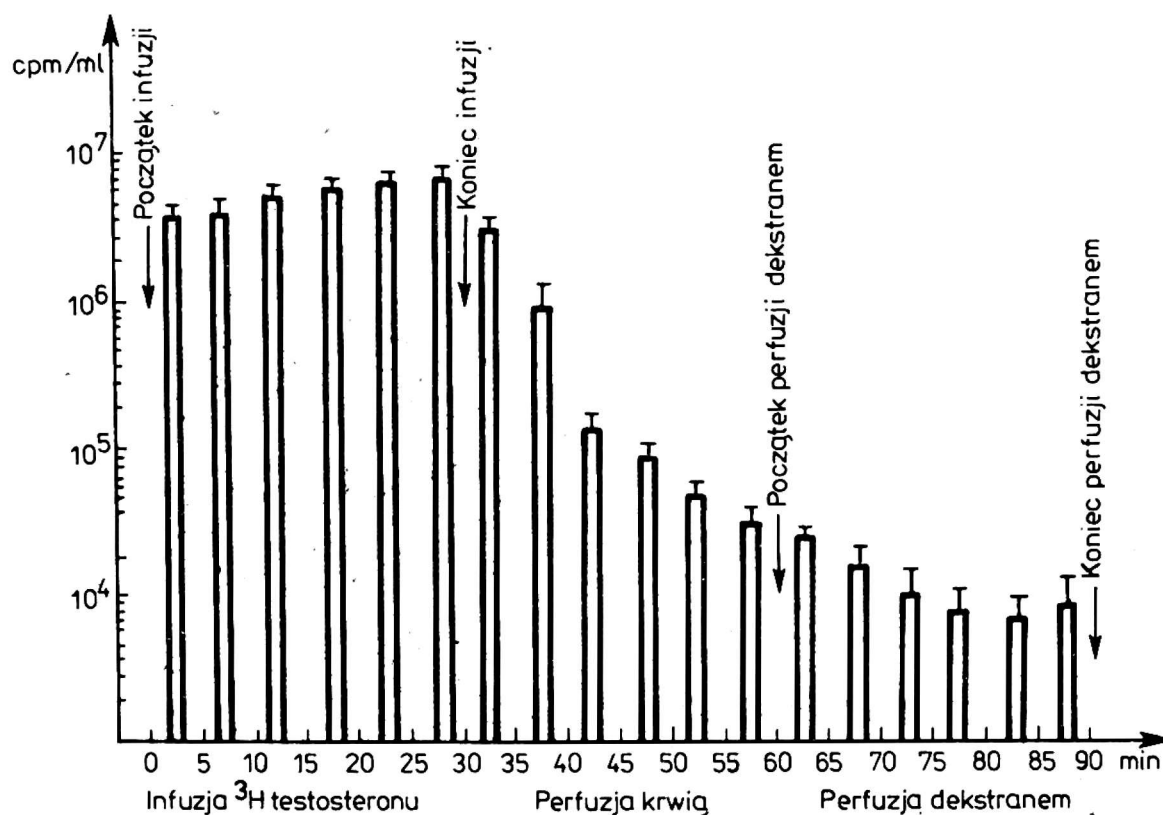
Wykonano oznaczenie konkurencji 5α -dihydrotestosteronu, estradiolu, progesteronu i kortyzolu o wiązanie z receptorami testosteronowymi, stosując 100-krotny nadmiar tych hormonów wobec ^3H -testosteronu. Obliczono konkurencyjność wymienionych hormonów, stosując wzór Atgera (1).

Identyfikacja białek cytozolowych obszaru
szypuły naczyniowej jajnika wiążących ^3H -testosteron

Próbki cytozoli inkubowanych z ^3H -testosteronem i pozbawionych wolnego hormonu przez adsorbcję na węglu opłaszczonym dekstranem oraz próby wzorcowe stanowiące 10-krotnie rozcieńczoną surowicę świńską rozdzielano na żelu poliakrylamidowym według metody Maurera [10]. Próby wzorcowe barwiono czernią amidową. Wycinki słupków żelu z próbami badanymi, odpowiadające poszczególnym frakcjom białek, ekstrahowano dwukrotnie 10 ml eteru etylowego. Radioaktywność ekstraktów mierzono w liczniku LS 100C Beckman. Wszystkie dane przedstawiono w postaci średnich arytmetycznych oraz poddano ocenie statystycznej według testu t Studenta.

WYNIKI

Porównanie aktywności ^3H -testosteronu, wynoszącej średnio $8,3 \cdot 10^6$ cpm, wprowadzanego do żyły jajnikowej podczas kolejnych 5-minutowych etapów infuzji, z aktywnością zawartą w wypływającej krwi żyłnej (rys. 1) wykazało, że część infundowanego hormonu została zatrzymana w obszarze szypuły naczyniowej jajnika.

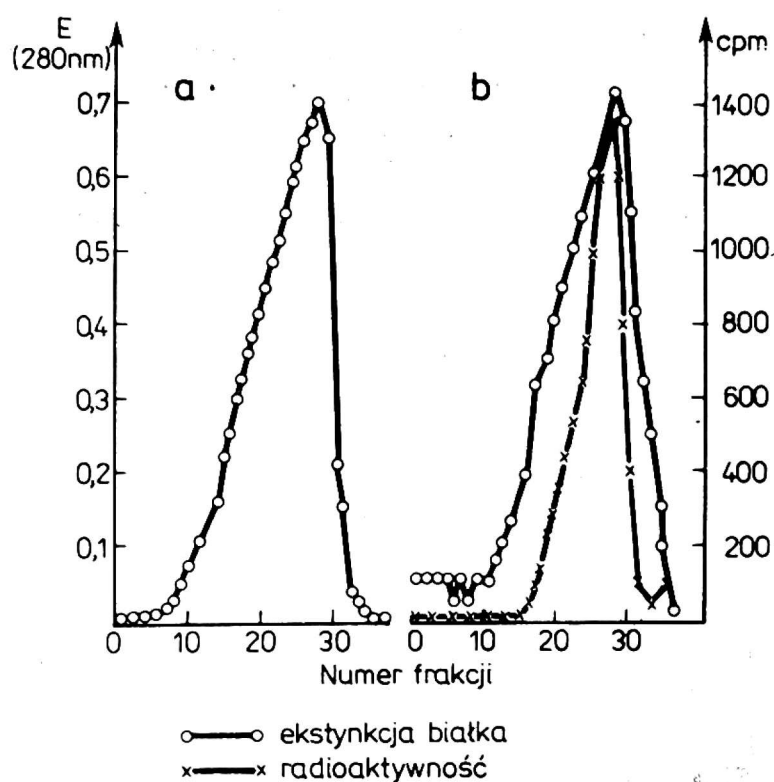


Rys. 1. Radioaktywność odzyskana z żyły jajnikowej podczas 30-minutowej infuzji ^3H -testosteronu ($8,3 \cdot 10^6$ cpm / 5 minut) i perfuzji preparatu krwią i dekstranem

Odzyskany podczas infuzji testosteron stanowił średnio $71,38 \pm 3,1\%$ ilości wprowadzonej. Perfuzja tkanek obszaru szypuły krwią spowodowała usunięcie $10,01 \pm 0,8\%$, a perfuzja dekstranem $0,08 \pm 0,02\%$ aktywności wprowadzonej do żyły jajnikowej. Łącznie odzyskano więc zaledwie $81,47\%$ radioaktywności użytej do infuzji.

Około 18% radioaktywności wprowadzonej do żyły jajnikowej pozostawało w tkankach obszaru szypuły naczyniowej jajnika jeszcze 60 minut po zakończeniu infuzji. Kontrola zawartości 3H testosteronu w radioaktywności zatrzymanej przez tkanki wykazała, że aktywność ta w 86% związana była z 3H -testosteronem. Wykonanie oznaczeń radioaktywności krwi żyłnej i dekstranu dla poszczególnych 5-minutowych okresów pozwala obserwować dynamikę zatrzymywania i uwalniania testosteronu przez obszar szypuły naczyniowej jajnika podczas infuzji i po jej zakończeniu (rys. 1).

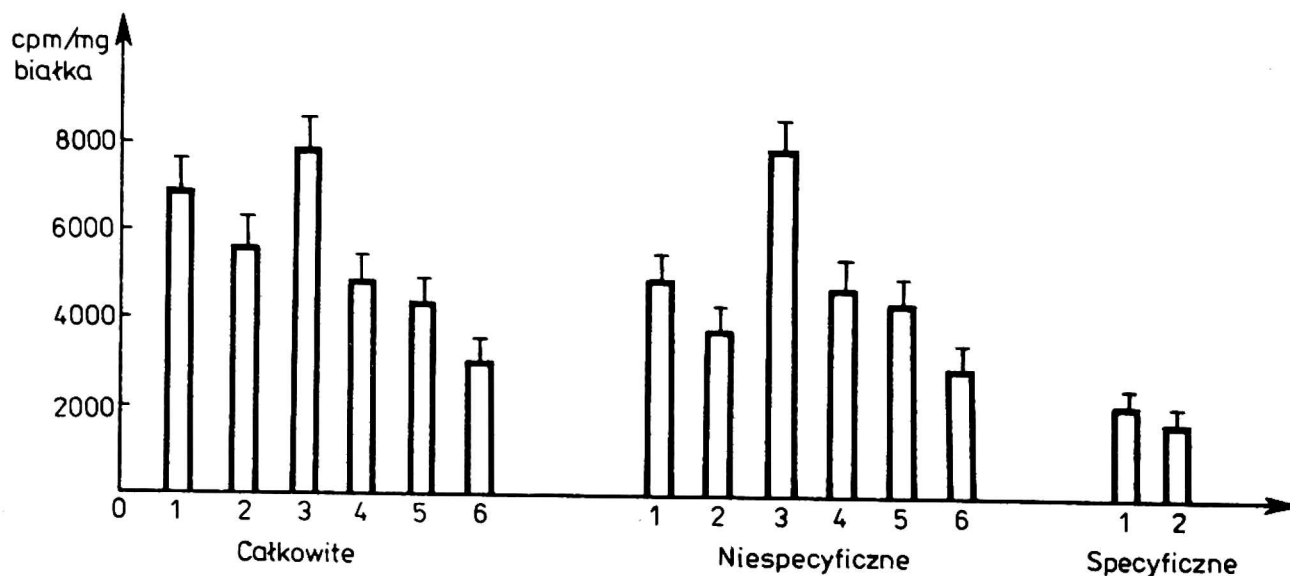
Cytozol uzyskany z tkanek obszaru szypuły naczyniowej jajnika wykazywał wysoką radioaktywność (około 70%) związaną z białkami. Wyniki analizy radioaktywnego cytozolu w liniowym gradiencie stężeń sacharozy przedstawiono na rysunku 2.



Rys. 2. Ekstynkcja białka frakcji próby wzorcowej (a) oraz ekstynkcja białka i radioaktywność cytozolu obszaru szypuły naczyniowej jajnika (b) po wirowaniu w liniowym gradiencie stężeń sacharozy

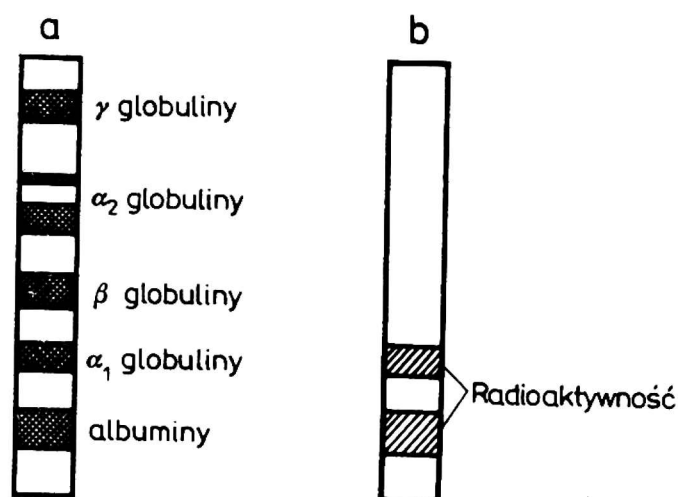
Białka związane z 3H -testosteronem charakteryzowały się masą cząsteczkową odpowiadającą masie albuminy surowicy wołowej, co wyklucza obecność 3H -testosteronu związanego z receptorami. Nieobecność receptorów testosteronowych w tych tkankach potwierdza kontrola radioaktywności frakcji jądrowej. Ekstrakt z oczyszczonej frakcji jądrowej tkanek obszaru szypuły naczyniowej jajnika, zawierający białka w stężeniu $1,96 \pm 0,2$ mg/ml, nie wykazywał radioaktywności.

Wartości przedstawione na rysunku 3 wskazują na wyjątkowo dużą pojemność wiązania 3H -testosteronu w obszarze szypuły naczyniowej jajnika, różniącą się statystycznie istotnie od pojemności innych badanych tkanek. Wiązanie to w całości miało charakter wiązania niespecyficznego, nie było więc wiązaniem receptorowym.



Rys. 3. Wiązanie ³H-testosteronu (15 pmoli ³H-T + 1,5 nmola T) w cytozolach: 1 - błony śluzowej, 2 - błony mięśniowej, 3 - szpudy, 4 - tętnicy macicznej, 5 - więzadła szerokiego, 6 - przepony

Radioaktywność obecna w cytozolach obszaru szpudy naczyniowej jajnika, inkubowanych z ³H-testosteronem po rozdzieleniu na żelu poliakrylamidowym, występowała w obszarze, w którym zlokalizowane były albuminy i α_1 -globuliny (rys. 4).



Rys. 4. Elektroforegramy surowicy świńskiej (a) i cytozolu obszaru szpudy naczyniowej jajnika znakowanego ³H-testosteronem (b)

Obecność wiązania receptorowego dla testosteronu stwierdzono natomiast w błonie śluzowej i mięśniowej macicy. Wyliczone metodą Scatcharda wartości K_D , określające powinowactwo wiązania receptorowego, wynosiły dla błony śluzowej $0,35 \pm 0,03$ nM i dla błony mięśniowej $0,39 \pm 0,03$ nM, natomiast pojemność tego wiązania wynosiła w błonie śluzowej $25,5 \pm 2,3$, a w błonie mięśniowej $21,62 \pm 2,0$ nmoli/mg białka. Receptory cytozolowe tkanek macicy były specyficzne dla testosteronu i istotną konkurencję o wiązanie wykazały tylko 5 α -dihydrotestosteron ($34,4 \pm 1,4\%$) i estradiol ($16,2 \pm 1,4\%$).

DYSKUSJA

Zdolność tkanek obszaru szypuły naczyniowej jajnika do wychwytu i zatrzymywania przez dość długi okres testosteronu, wykazana przez Krzymowskiego i wsp. [6, 8], nasunęła przypuszczenie o możliwości występowania w tych tkankach receptorów testosteronowych i ich udziału w realizacji regulacyjnych funkcji testosteronu.

W przedstawionych badaniach nie stwierdzono wiązania receptorowego w tkankach szypuły naczyniowej jajnika, podobnie jak w innych fragmentach więzadła szerokiego, podczas gdy w zastosowanych w celu porównawczym tkankach macicy oznaczono specyficzne dla testosteronu receptory cytozolowe o powinowactwie zbliżonym do występującego u innych gatunków.

Na podkreślenie natomiast zasługuje duża pojemność wiązania testosteronu w tkankach obszaru szypuły naczyniowej jajnika, statystycznie istotnie wyższa niż w innych fragmentach więzadła szerokiego. Wiązanie to w całości posiadało cechy wiązania niespecyficznego (rys. 3), a zatem było stosunkowo mało trwałe.

Wymienione cechy wiązania, jakie tworzą białka komórkowe tkanek obszaru szypuły naczyniowej jajnika z testosteronem, pozwalają na powiązanie dużych ilości hormonu wytwarzanego w jajniku i docierającego z limfą do tego obszaru. Powoduje to lokalną koncentrację testosteronu [5]. Jednocześnie mała trwałość tego wiązania umożliwia szybkie oddysocjowanie testosteronu od cząstek białkowych i zwiększenie puli wolnego hormonu, a więc formy, która drogą przeciwną do przenikania może być przekazana do krwi tętniczej, zaopatrującej jajnik i stanowić dlań dodatkowe źródło testosteronu [3].

PODSUMOWANIE

Stwierdzona w niniejszej pracy niespecyficzna forma wiązania testosteronu z białkami komórek szypuły naczyniowej jajnika, odmienna niż w błonie śluzowej i mięśniowej macicy, wskazuje na zupełnie różny cel pojawiania się tego hormonu w sąsiadujących ze sobą tkankach. Z przedstawionych bowiem badań wynika, że obszar szypuły naczyniowej jajnika posiada nie tylko adaptowany do wychwytu i przeciwną do przenoszenia hormonów sterydowych układ krążenia [8], lecz jest również przystosowany do okresowego zatrzymywania testosteronu.

LITERATURA

1. Atger M., Baulieu E.E., Milgrom E.: An investigation of progesterone receptors in guinea pig vagina, uterine cervix, mammary glands, pituitary and hypothalamus. *Endocrinol.*, 1974, 94, 161-167.

2. Castaneda E., Liao S.: The use anti-steroid antibodies in the characterization of steroid receptors. *J. biol. Chem.* 1975, 250, 883-888.
3. Einer-Jansen N.: In vitro measurements of progesterone binding to proteins in plasma. *Abstr. 17th Scandinavian Congr. Physiology, Reykjavik, 1982.*
4. Giannopoulos G.: Binding of testosterone to uterine components of the immature rat. *J. biol. Chem.*, 1973, 248, 1004-1010.
5. Kotwica J., Krzymowski T., Stefańczyk S., Nowicka R., Dębek J., Czarnocki J., Kuźnia S.: Steroid concentrating mechanism in the sow's ovarian vascular pedicle. *Adv. Physiol. Sci.*, 1981, 20, 149-152.
6. Krzymowski T., Kotwica J., Stefańczyk S.: Venous - arterial counter - current transfer of ^3H -testosterone in the vascular pedicle of the sow ovary. *J. Reprod. Fert.*, 1981, 61, 317-323.
7. Krzymowski T., Kotwica J., Stefańczyk S., Czarnocki J., Dębek J.: A subovarian exchange mechanism for the counter - current transfer of ovarian steroid hormones in the pig. *J. Reprod. Fert.*, 1982, 65, 457-465.
8. Krzymowski T., Stefańczyk S., Koziorowski M., Czarnocki J., Ruszczyk T., Nowicka R.: Role of the mesosalpinx and oviduct vasculature in the counter - current transfer of steroid hormones into the ovary. *Anim. Reprod. Sci.*, 1982, 5, 25-39.
9. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.: Protein measurements with the Folin - fenol reagent. *J. biol. Chem.* 1951, 193, 265-276.
10. Maurer H.R.: *Primienienije disk - elektroforeza w medicinskoj chimii. Disk - elektroforez. Teorija i praktika elektroforeza w poliakrylamidnom giele.* Mir, Moskwa, 1971, 159-188.

S. Stefańczyk

MECHANISM OF BINDING OF TESTOSTERONE
BY OVARIAN VASCULAR PEDICLE AND UTERUS

Summary

A dynamic of the uptake and capture of ^3H -testosterone ($^3\text{H-T}$) in the vascular pedicle region of the isolated ovary after hormone infusion into ovarian vein was studied in pigs.

A high radioactivity found in cytosol of those tissues was mostly bound by proteins (over 70%). Molecular weight of the binding proteins of cytosole and the absence of the radioactive testosterone in nuclear fraction suggests none receptor character of the binding.

Gel electrophoresis of ³H-T cytosol and analysis in sucrose gradient allowed to define the protein properties as very similar to albumine and α₁ globuline.

Testosterone receptors determined by charcoal technique were not found in vascular pedicle tissues but they occurred in the uterine. Capacity of total binding of testosterone in the vascular pedicle region was considerable higher than in other tissues.

С. Стефаньчик

МЕХАНИЗМ СВЯЗЫВАНИЯ ТЕСТОСТЕРОНА В ОБЛАСТИ СОСУДИСТОГО СТЕБЛЯ ЯИЧНИКА И МАТКИ

Р е з ю м е

Исследовали динамику поглощения и задерживания ³H-тестостерона (³H-T) в области тканей сосудистого стебля после его инфузии в вену изолированного яичника. В цитозолях этих тканей обнаружили высокую радиоактивность, связанную в свыше 70% с белками. На основании определения молекулярной массы нерецепторных связывающих белков цитозоля, а также анализа радиоактивности ядерной фракции, констатировали отсутствие тестостероновых рецепторов в тканях стебля. Электрофоретическое разделение меченых ³H-T цитозолей и центрифугирование в линейном градиенте концентраций сахарозы показали, что тестостерон связывается с белками, подобными альбуминам и α₁-глобулинам. Результаты анализа цитозольных рецепторов по методу адсорбции на угле свидетельствовали об отсутствии рецепторов тестостерона в области сосудистого стебля и об явственном их содержании в тканях матки. Констатировали существенно высшее количество связывающих мест для тестостерона в области стебля, по сравнению с другими тканями.