

JERZY GALAS*

Aktywność hormonalna *in vitro* izolowanych pęcherzyków jajnikowych nornicy rudej

S t r e s z c z e n i e

Badano aktywność hormonalną dużych pęcherzyków izolowanych z jajników 78 - 80-dniowych dziewiczych samic nornicy rudej, urodzonych i hodowanych w długim fotoperiodzie. Pęcherzyki izolowano bez uwzględnienia cyklu płciowego, który u zwierząt z indukowaną owulacją nie występuje z cykliczną regularnością. Pęcherzyki hodowano organotypowo przez 24 godziny. Przeprowadzono hodowle kontrolne i z dodatkiem hormonów gonadotropowych w stężeniu 100 ng/ml: hormonu luteinizującego (LH) i prolaktyny (PRL). Metodą radioimmunologiczną oznaczono w pożywkach: progesteron (P), estrogeny (E) i androgeny (A). Hodowane pęcherzyki nornicy wydzielały, podobnie jak u innych gryzoni, trzy badane grupy steroidów. Obserwowana sekrecja badanych steroidów odzwierciedlała aktywność hormonalną pęcherzyków w momencie ich izolowania. Dodatek LH stymulował, a PRL obniżał sekrecję wydzielanych hormonów steroidowych. Otrzymane wyniki wykazały zdolność reagowania izolowanych pęcherzyków jajnikowych nornicy na hormony gonadotropowe *in vitro*.

* Pracownia Endokrynologii Zwierząt i Hodowli Tkanek, Zakład Fizjologii Zwierząt, Instytut Zoologii Uniwersytetu Jagiellońskiego

Autor artykułu serdecznie dziękuje prof. dr hab. Stanisławie Stokłosowej za cenne krytyczne uwagi i życzliwą pomoc w trakcie wykonywania pracy.

Wstęp

Nornica ruda (*Clethrionomys glareolus* Schreber) jest zwierzęciem mnożącym się sezonowo. Okres rozrodczy występuje od kwietnia do sierpnia, a więc w czasie trwania długiego dnia (Clarke, 1985, Clarke i współ., 1977). U zwierząt adaptowanych do warunków hodowli, reżim świetlny długiego dnia, np. 18L:6D (18 godzin światła i 6 godzin ciemności) stymuluje funkcję gonad badaną częstotliwością zachodzenia w ciążę (Tähkä i współ., 1982). Brak jest natomiast ilościowych danych funkcji sekrecyjnej gonad.

Nornice jako zwierzęta rozmnażające się sezonowo, są zależne od fotoperiodu, regulującego ich rozród. Z badań na szczurach wiadomo, że hormony gonadotropowe stymulują steroidogenezę w jajnikach samic (Stokłosowa, Naibandov, 1972). Celem przedstawionej pracy było zbadanie czy fotoperiod moduluje sekrecyjną funkcję pęcherzyków jajnikowych nornic i czy zmienia wpływ hormonów luteinizującego i prolaktyny na syntezę hormonów steroidowych w jajniku.

Materiał i metody

Mioty nornic hodowano w warunkach laboratoryjnych według Tähkä (1980), w reżimie świetlnym długiego fotoperiodu 18L:6D (światło od 6.00 do 24.00). Młode samice oddzielano od samców po zaprzestaniu karmienia przez matkę. Karmiono je dietą według Clarke'a (1985) i Tähkä (1980). Samice urodzone w tym reżimie świetlnym i dalej w nim hodowane zabijano po osiągnięciu wieku 78-80 dni.

Jajniki nornic, a zwłaszcza pęcherzyki jajnikowe są bardzo małe. Największe pęcherzyki przedowulacyjne mają średnicę zaledwie 1.0 mm. Jałowo wypreparowane jajniki umieszczano w pożywce Eagle'a, a następnie pod lupą izolowano z nich duże pęcherzyki jajnikowe o średnicy od 0.61-1.0 mm (Galas i Stokłosowa, w druku).

Pęcherzyki takie hodowano w temp. 37°C metodą organotypową według metody Fainstat'a (1972) w buteleczkach Leightona przez 24 godziny. Pożywką było medium Eagle'a wzbogacone dodatkiem 10% surowicy cielecej. Wobec zachowania wysokiej aseptyki pracy nie dodawano do pożywki antybiotyków. Po 24 godzinach hodowli pożywkę zlewano, zamrażano i przechowywano w temp. -20°C do czasu dalszej analizy steroidów.

Prowadzono 3 rodzaje kultur pęcherzyków:

- 1) w pożywce kontrolnej bez dodatku hormonów,
- 2) w pożywce z dodatkiem 100 ng LH/ml,
- 3) w pożywce z dodatkiem 100 ng PRL/ml.

Analiza hormonów steroidowych

W pożywkach oznaczano zawartość wydzielonych androgenów, progesteronu i estrogenów przy pomocy odpowiednich metod radioimmunologicznych.

Androgeny oznaczano wg Dufau i współ., (1972). Znacznikiem był [1,2,6,7-³H] Testosterone o sp. akt. 89 Ci/mmol, wyprodukowany przez Amersham International plc. Używano przeciwciała królicze, które otrzymano przez nastrzykiwanie zwierząt testosterone-3-(O-carboxymethyl) oxime połączonym z BSA (dar dr B. Ričarovej z Institute of Radiology, Czechosłowackiej Akademii Nauk). Dawalo ono reakcje krzyżowe z dihydrotestosteronem w 18.3%, z androstendiolem w 0.65%, z androsteronem w 0.06%, z epitestosteronem w 0.03%, a resztę testowanych steroidów wiązało poniżej 0.01%. Krzywa miała przebieg od 5 do 200 pg. Błędy wewnątrzseryjne były mniejsze od 5%, a międzyseryjne od 9.6%.

Progesteron oznaczano wg Abrahama i współ., (1971), używając [1,2,6,7-³H] Progesterone (sp. akt. 96 Ci/mmol: Amersham International plc.) jako znacznika i owcze przeciwciała otrzymane przez

immunizowanie zwierząt 11α -hydroxy-progesterone succinyl-BSA (dar prof. B. Cooka z Uniwersytetu w Glasgow). Dawało ono następujące reakcje krzyżowe: z pregnenolonem 1.8%, z kortykosteronem 1.5%, z 17α -OHP 0.8%, z testosteronem 0.12% i z androstendionem 0.02%. Pozostałe steroidy dawały reakcje krzyżowe niższe od 0.01. Krzywa standardowa miała przebieg od 20 do 1000 pg. Błędy wewnątrzseryjne były mniejsze od 5%, a międzyseryjne od 9.8%.

Estrogeny oznaczano wg Hotchkiss i współ. (1971), używając $[2,4,6,7,16,17-^3\text{H}]$ Oestradiolu (sp. akt. 140 Ci/mmol: Amersham International plc) jako znacznika i królicze przeciwciała wyprodukowane w odpowiedzi na iniekcje ligandu 17β -estradiol-o-CMO:BSA (dar prof. R. Rembiesy z Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie). Reakcje krzyżowe z 16-ketoestradiolem- 17β wynosiły 1%, z estronem i estriolem 0.8%, z testosteronem 0.1%, a z resztą testowanych steroidów poniżej 0.01%. Krzywa standardowa miała przebieg od 5 do 200 pg, błędy wewnątrzseryjne były mniejsze od 4%, a międzyseryjne od 7.5%.

Ilość hormonów obliczano w pikogramach (pg) i nanogramach (ng) na jeden pęcherzyk i przedstawiono na skali półlogarytmicznej.

Odczynniki:

W hodowli stosowano pożywkę Eagle'a (Wytwórnia Surowic i Szczepionek Lublin) i surowicę cielęcą (Instytut Immunologii Wrocław).

Wszystkie odczynniki używane do oznaczeń radio-immunologicznych miały wysoki stopień czystości, a takie jak alkohol, eter etylowy i n-heksan były destylowane przed użyciem. Stosowano następujące hormony gonadotropowe:

LH (NIH-LH-S-20 ovine),

PRL (NIH-PRL-ovine Biological Standards).

Wyniki

Pęcherzyki dobrze przeżywały w ciągu 24 godzin i wydzielaly w hodowli kontrolnej 333 pg progesteronu, 63 pg estrogenów i 26 pg androgenów na 1 pęcherzyk (ryc. 1). Wyższa zawartość E od A świadczyła o braku zmian atretycznych w pęcherzykach.

Dodatek hormonu luteinizującego do pożywki istotnie stymulował wydzielanie progesteronu ($p < 0.001$) i estrogenów ($p < 0.05$), natomiast w przypadku androgenów stymulacja była statystycznie nieistotna. W obecności LH ilość wydzielanego progesteronu wzrastała 8-krotnie, estrogenów 4-krotnie, a androgenów 2-krotnie (ryc. 1).

Natomiast dodatek prolaktyny działał wyraźnie supresyjnie na wydzielanie progesteronu (ilość wydzielonego progesteronu malała pod wpływem PRL 9-krotnie) i estrogenów (4-krotnie w porównaniu z kontrolną hodowlą), a w mniejszym stopniu na wydzielanie androgenów (ilość wydzielonych androgenów malała 2-krotnie, ryc. 2). Ponieważ ilość hormonów wydzielanych przez pęcherzyki wahała się znacznie, zaobserwowane różnice były statystycznie nieistotne.

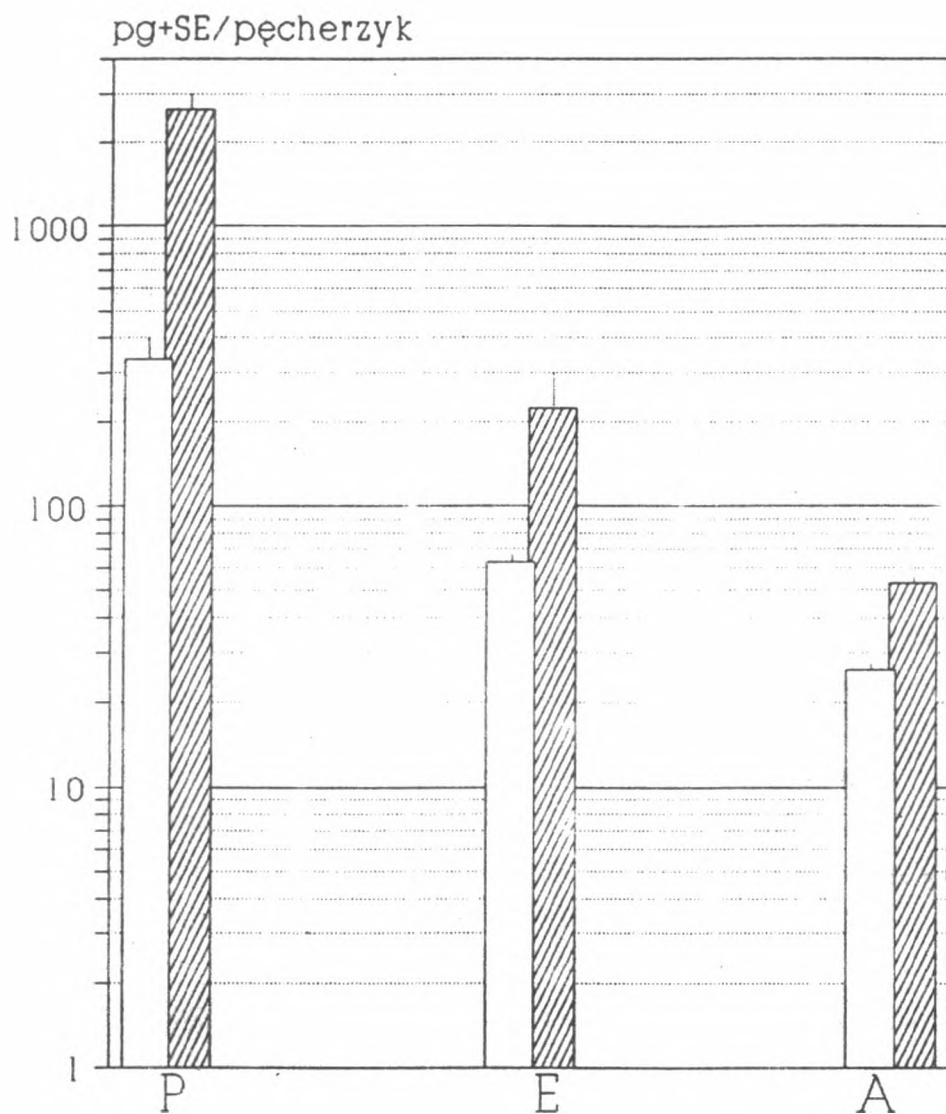
Dyskusja

Przedstawione wyniki (ryc. 1 i 2) wykazały, że duże pęcherzyki wyizolowane z jajników nornic hodowanych w długim fotoperiodzie wydzielaly, podobnie jak u innych gryzoni laboratoryjnych, wszystkie trzy badane grupy steroidów, a mianowicie: progesteron, estrogeny i androgeny (Madej 1986, Szoltyś 1981). Hodowane pęcherzyki przedowulacyjne szczura wydzielaly bowiem duże ilości progesteronu oraz estrogenów, jak wykazali Szoltyś i współ. (1982).

W przedstawionym doświadczeniu izolowano pęcherzyki bez uwzględnienia cyklu płciowego, który u zwierząt sezonowych i nieowulujących spontanicznie nie występuje z cykliczną regularnością jak u szczurów. Obserwowana sekrecja 3 badanych grup steroidów od-

Nornica ruda (*Cl. glareolus*)

Pęcherzyki duże

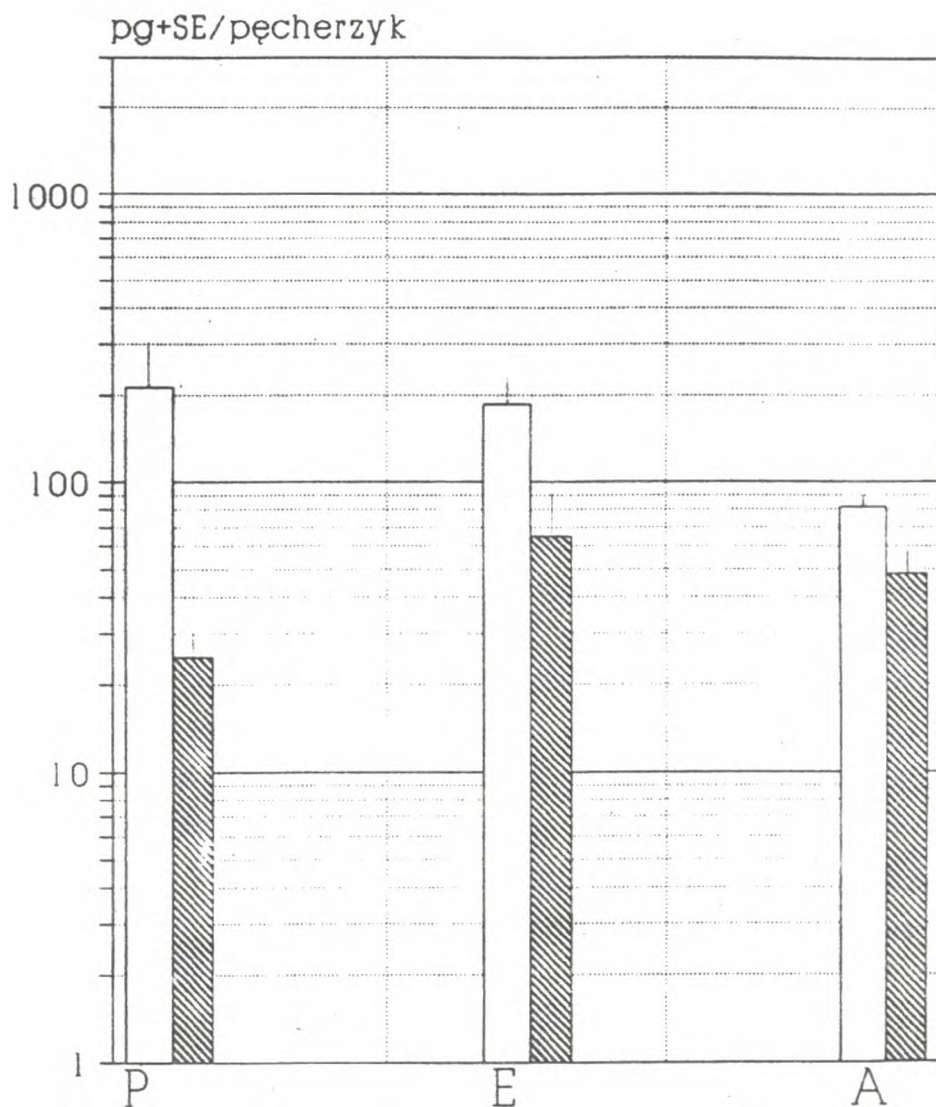


P-progesteron, E-estrogeny, A-androgeny

Ryc. 1. Wydzielanie progesteronu -P, estrogenów -E i androgenów -A przez pęcherzyki jajnikowe w hodowli kontrolnej (słupki białe) i w hodowli z dodatkiem LH (słupki kreskowane)

Nornica ruda (*Cl. glareolus*)

Pęcherzyki duże



P-progesteron, E-estrogeny, A-androgeny

Ryc. 2. Wydzielanie progesteronu -P, estrogenów -E i androgenów -A przez pęcherzyki jajnikowe w hodowli kontrolnej (słupki białe) i w hodowli z dodatkiem PRL (słupki kreskowane)

1

zwierciedlała aktywność hormonalną pęcherzyków w momencie izolowania. Wszystkie nornice użyte w doświadczeniach, były osobnikami dziewiczymi, które nigdy przedtem nie owulowały. W jajnikach brak było ciałek żółtych.

Pęcherzyki nie były atretyczne, bowiem wydzielaly znacznie większe ilości estrogenów niż androgenów. Na wprowadzenie do pożywki hormonu luteinizującego reagowały one podwyższoną sekrecją steroidów w sposób bardzo widoczny (ryc. 1). Świadczyło to o tym, że pęcherzyki w hodowli zachowywały receptory LH i były zdolne do wzmożonej produkcji, szczególnie P, co jest cechą charakterystyczną przedowulacyjnych pęcherzyków po endogennej fali LH (Szołtys, 1976, 1981).

Prolaktyna działała tłumiąco na sekrecję pęcherzykowych steroidów. Podobne hamujące działanie prolaktyny na wydzielanie P i E przez izolowane komórki jajnikowe świni obserwowano w hodowli tkankowej (Stokłowska, 1989).

Wydaje się zatem, że pęcherzyk jajnikowy nornicy rudej reaguje podobnie na dodatek LH i PRL jak pęcherzyk zwierząt laboratoryjnych lub hodowlanych.

Przedstawione wyniki są pierwszymi danymi o funkcji hormonalnej jajników nornic i stanowią zachętę do dalszych badań nad regulacją hormonalną rozrodu samic nornicy rudej.

Literatura

- Abraham G.E., Swerdloff R., Tulchinsky D., Odel W.D., 1971. Radio-immunoassay of progesterone. *J. Clin. Endocr.* 32, 619-624.
- Clarke J.R., Hellwing., 1977. Remote control by males of ovulation in band voles (*Clethrionomys glareolus*). *J. Reprod. Fert.* 50, 155-158.

- Clarke J.R., 1985. The reproductive biology of the bank vole (*Clethrionomys glareolus*) and the wood mouse (*Apodemus sylvaticus*). Symp. zool. Soc. Lond. 55, 33-59.
- Dufau M.L., Catt K.J., Tsuruhara T., Ryan D., 1972, Radioimmunoassay of plasma testosterone. Clin. chim. Acta, 37, 109.
- Fainstat Th., 1972. Submerged organ culture: An improved method. *In Vitro*, 7 300-303.
- Hotchkiss J., Knobil E., Atkinson L.E., 1971. Radioimmunoassay of estradiol in small volumes of peripheral plasma. *Endocrinology* 89, 177-183.
- Madej E., 1986. Effect of exogenous hormones on estrogen and progesterone release from cultured rat granulosa cells from various stages of estrous cycle. *Endocr. Exp.*, 20, 393.
- Stokłosowa S., 1989. The interaction of follicular cells and steroidogenic activity of the ovary. *Acta Physiol. Pol.*, 40, 35.
- Stokłosowa S., Nalbandov A.V., 1972. Luteinization and steroidogenic activity of rat ovarian follicles cultured *in vitro*. *Endocrinology*, 91, 25-32.
- Szołtys M., 1976. Progestagen dynamics in preovulatory follicles of rats. *J. Reprod. Fert.*, 48, 397.
- Szołtys M., 1981. Oestrogens and progestagens in rat ovarian follicles during the oestrous cycle. *J. Reprod. Fert.*, 63, 221.
- Szołtys M., Stokłosowa S., Kasten F., 1982. Hormonal secretion of cultured rat ovarian follicles isolated at various hours of proestrus. *In Vitro*, 18, 463.
- Tähkä K.M., 1980. A histochemical study on the effects of photoperiod on gonadal and adrenal function in the female bank vole (*Clethrionomys glareolus*, Schreb.) *Gen. Comp. Endocrinol.* 41, 41-52.

Tähkä K.M., Teräväinen T., Wallgren H., 1982. Effect of photoperiod on the testicular steroidogenesis of bank vole (*Clethrionomys glareolus*, Schreber): An *in vitro* study. Gen. Comp. Endocrinol. 47, 377-384.

Jerzy Galas

IN VITRO HORMONAL ACTIVITY OF
ISOLATED OVARIAN FOLLICLES OF BANK VOLE

S u m m a r y

The hormonal activity of large follicles isolated from the ovaries of 78-80 day old virgin female bank voles, kept in a long photoperiod was investigated. The follicles were isolated without estimating the stage of the estrus cycle, as the cycle of the animals with induced ovulation is very irregular. The follicles were cultured as organ culture for 24 h, alone or with addition of either LH (100 ng/ml) or PRL (100 ng/ml). In the collected culture medium progesterone (P), estrogens (E), and androgens (A) were estimated.

The cultured follicles of bank voles secreted, similarly to other rodents, 3 types of steroids. As had been observed in rats, the secretion of investigated steroids reflected the hormonal activity of follicles at the moment of isolation. The addition of LH stimulated while PRL inhibited the follicular steroid secretion. The results showed that the isolated ovarian follicles of bank voles were able to react to gonadotropic hormones *in vitro*.

ГОРМОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ *IN VITRO*
ИЗОЛИРОВАННЫХ ЯИЧНИКОВЫХ ПУЗЫРЬКОВ РЫЖЕЙ ПОЛЁВКИ

Р е з ю м е

Исследовали гормональную активность больших яичниковых пузырьков, изолированных из яичников девственных 78–80 дневных самок рыжей полёвки, рождённых и выращиваемых в длинном фотопериоде. Пузырьки изолировали, не учитывая при этом полового цикла, который у животных с индуцированной овуляцией не наблюдается с цикличной регулярностью. Пузырьки культивировали органотипно в течении 24 часоб. Применяли контрольные культуры, а также культуры с примесью гонадотропных гормонов, концентрацией 100 $\mu\text{g}/\text{мл}$: LH и PRL (пролактин). В питательных средах радиоиммунологическими методами определяли: прогестерон (P), эстрогены (E), андрогены (A). Из культивированных пузырьков полёвки выделялись (как и у других грызунов) три вида исследуемых стероидов. Наблюдаемая секреция исследуемых стероидов (так же как и у крыс) отражает собой гормональную активность пузырьков в момент изолирования. Добавление LH вызывает стимуляцию, а PRL снижение секреции стероидных гормонов, выделяемых пузырьками. Полученные результаты указывают на способность реагирования изолированных яичниковых пузырьков полёвки на гонадотропные гормоны *in vitro*.