

AKTYWNOŚĆ ENZYMÓW STERYDOGENEZY W IZOLOWANYCH KOMÓRKACH JAJNIKA KROWY I ŚWINI

Anna Stadnicka, Stanisława Stokłosowa

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

WSTĘP

Komórki granulocyty pobrane z pęcherzyków jajnikowych świń w warunkach hodowli *in vitro* są zdolne do syntezy hormonów sterydowych, co zostało wykazane przez Schomberga (1969) i Channing (1970). Brak jednak podobnych danych dla komórek granulocyty krowy. Brak również doniesień dotyczących zmian histochemicznych, jakim w hodowli *in vitro* podlegają komponenty jajnika krowy i świni. Podjęta została więc próba przebadania w tym aspekcie izolowanych komórek granulocyty i osłonki wewnętrznej pęcherzyków jajnikowych u obu gatunków zwierząt. W tym celu starano się uzyskać czyste zawiesiny obu typów komórek, które następnie adaptowano do uproszczonych warunków hodowli tkankowej, aby w końcu przebadać je pod względem histochemicznym, oznaczając aktywność podstawowych enzymów biorących udział w biosyntezie hormonów sterydowych.

MATERIAŁ I METODY

Do doświadczeń użyte zostały jajniki krowy i świni w późnej fazie folikularnej. Jajniki pobierano od zwierząt rzeźnych po około 30 min od momentu zabicia. Po kilkakrotnym płukaniu w soli fizjologicznej, zawierającej antybiotyki, z jajników izolowano całe, dojrzałe pęcherzyki, o bogato ukrwionej tece. Z jajników świńskich izolowano pęcherzyki o średnicy 7-9 mm, z jajników krowich pęcherzyki o średnicy 12-15 mm.

Komórki granulocyty pobierano metodą Channing. Osłonkę wewnętrzną pęcherzyka oddzielano od zewnętrznej, oczyszczano bardzo dokładnie z pozostałych komórek granulocyty i trypsynowano. Izolowane komórki

zawieszano w pożywce, którą było medium 199 Parkera, zawierające 15% surowicy cielej i antybiotyki.

Hodowle zakładano w probówkach Leightona. Ilość komórek wahała się zwykle w granicach od 800 000 do 1 000 000 na ml.

Hodowane komórki badano codziennie, barwiąc monolayers barwnikami Giemsy lub Wrighta. Wykonywano test na lipidy oraz reakcje histochemiczne na obecność enzymów: dehydrogenaz $\Delta^53\beta$ -hydroksysterydowej, 17β -hydroksysterydowej, 20α -hydroksysterydowej i dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej. Reakcję histochemiczną oceniano, stosując 5-stopniową skalę ocen, opracowaną według zasad przyjętych w histochemii.

WYNIKI

Komórki granulocyty świni wymagały na osadzenie się, przymocowanie do szkła i adaptację do warunków hodowli od 3 do 5 dni. Czas ten dla komórek granulocyty krwi był krótszy o 2 dni. Pomiedzy 5 a 11 dniem hodowli komórki wzrastały intensywnie, zachowując typowy nabłonkowy kształt; obserwowano liczne mitozy. Występująca pod koniec hodowli zmiana kształtu w kierunku fibroblastycznym, silna wakuolizacja plazmy i złuszczenie komórek świadczyły o rozpoczynającej się degeneracji. Komórki granulocyty zawierały dość liczne krople lipidów, usytuowane zwykle w obwodowej części plazmy komórkowej. Ilość lipidów malała znacznie w końcowym okresie hodowli.

Komórki osłonki wewnętrznej łatwo adaptowały się do hodowli, ale wzrost ich był wolniejszy. Mniejsze od komórek granulocyty — miały nieco fibroblastyczny lub listkowy kształt. W plazmie występowały także drobne krople lipidów. Degeneracja związana ze starzeniem się komórek rozpoczynała się około 12 dnia hodowli. Polegała na silnym zwakuolizowaniu części przyjądrowej plazmy, zmniejszeniu ilości lipidów, niszczeniu plazmy i obumieraniu komórek.

Aktywność enzymów w badanych komórkach przedstawiała się w następujący sposób:

Komórki granulocyty — aktywność $\Delta^53\beta$ -SDH była dość wysoka i utrzymywała się na stałym poziomie przez cały okres hodowli. Różnic gatunkowych nie stwierdzono. 17β -SDH wykazywała niską aktywność, jej niewielki wzrost obserwowano w 4 i 11 dniu w komórkach świni, i między 6 a 8 dniem w komórkach krwi. Komórki granulocyty świni wykazywały bardzo niską aktywność 20α -SDH, u krwi aktywność enzymu rosła od 5 dnia hodowli, ale nigdy nie przekraczała wartości średnich. Aktywność G6P-DH rośnie stopniowo w komórkach świni, u krwi enzym ten jest bardzo aktywny od początku hodowli.

Комórki osłonki wewnętrznej — $\Delta^53\beta$ -SDH była bardzo aktywna, wykazywała silne wahania i tendencję wzrostową w komórkach krowy, mniejsze wahania i tendencję spadkową w komórkach świni. Aktywność 17β -SDH była wyższa w komórkach teki, w porównaniu z komórkami granulocy; u krowy stopniowo wzrastała, u świni początkowo dość wysoka, znacznie malała w końcowym okresie hodowli. Komórki teki wykazywały także znacznie wyższą aktywność 20α -SDH, która w komórkach krowy rosła nieco powyżej wartości średnich. G6P-DH była bardzo aktywna przez cały okres hodowli w komórkach świni, w komórkach krowy zaś wykazywała znaczne wahania aktywności.

Izolowane komórki granulocy i osłonki wewnętrznej adaptują się do określonych warunków hodowli tkankowej. Zmiany cytomorfologiczne i cytochemiczne, jakim podlegają, a przy tym duża aktywność dehydrogenaz $\Delta^53\beta$ -hydroksysterydowej i glukozo-6-fosforanowej świadczą o tym, że oba typy komórek ulegają luteinizacji w hodowli *in vitro*.

Dalsze badania, polegające na sprawdzeniu wrażliwości badanych komórek na zadziałanie hormonów gonadotropowych, pozwolą być może na stwierdzenie, która z badanych tkanek ulega silniejszej luteinizacji i jaki jest udział obu tkanek w syntezie hormonów sterydowych.

Анна Стадни́ца, Станислава Стокло́сова

АКТИВНОСТЬ ЭНЗИМОВ СТЕРИДОГЕНЕЗЫ В ИЗОЛИРОВАННЫХ КЛЕТКАХ ЯИЧНИКА КОРОВЫ И СВИНЬИ *IN VITRO*

Резюме

Изолированные клетки гранулоза и внутренней оболочки яичниковой фолликулы культивировали как отдельные monolayers. Клетки гранулоза отбирали из яичников свињи и коровы в фолликулярной фазе полового цикла по методу Ченнинга.

Клетки внутренней оболочки фолликулы извлекали из мануально отделенной оболочки после ее предварительной трипсинизации 0,25%-ным раствором трипсина. Культуры велись в пробирках Лейтона на питательной среде составленной из жидкости Паркера телячьей сыворотки. Культуры отличались хорошим ростом, а клетки — типичной лютеальной формой.

В культивированных клетках проводились гистохимические исследования следующих энзимов:

- $\Delta^53\beta$ — ОН стеридной дегидрогеназы,
- 17β — ОН стеридной дегидрогеназы,
- 20α — ОН стеридной дегидрогеназы и глюкозо-6-фосфатной дегидрогеназы.

Два первых энзима показывали характерные колебания активности в течение 15-18 дней культуры, 20α ОН SDH появлялась в более поздних днях куль-

туры (обычно на 8-ой день), а глюкозо-6-фосфатная дегидрогеназа проявляла активность в течение всего периода культуры.

Активность вышеуказанных энзимов связана с лютеинизацией яичниковых клеток *in vitro*.

Anna Stadnicka, Stanisława Stokłosowa

THE ACTIVITY OF SOME STEROIDOGENIC ENZYMES IN THE CELLS ISOLATED FROM BOVINE AND PORCINE OVARIES

Summary

Isolated granulosa and theca interna cells were cultured as separate monolayers. Granulosa cells were collected from bovine and porcine ovaries in follicular phase of cycle according to Channing. Theca interna cells were obtained by manual separation followed by trypsinization in 0.25% trypsin.

Cells were grown in Leighton tubes, on Parkers 199 medium containing 15% of calf serum. Both types of cells were morphologically luteinized and showed activity of $\Delta^53\beta$ -, 17β -, and 20α -hydroxysteroid dehydrogenases as well as G6P dehydrogenase.

Dr Anna Stadnicka
Wydział Biologii i Nauk o Ziemi UJ
Instytut Zoologii
Zakład Fizjologii Zwierząt
30-060 Kraków, ul. Krupnicza 50