



UTEROTONISCHE AKTIVITÄT DES NEUROHYPOPHYSENHORMONS OXYTOCIN AN UTERUSZELLKULTUREN.

H. Albertin-Kohlhauf, Institut für Nutztierwissenschaften,
Gruppe Tierzucht, ETH-Zürich, Tannenstrasse 1, 8092 Zürich

ZUSAMMENFASSUNG

Zum Entwurf neuer Pharmaka für die Human- und Veterinärgynäkologie und -Geburtshilfe werden Versuche an isolierten Rattenuteri benützt. Diese in vitro Versuche sind auch für die Qualitätskontrolle der Neurohypophysepräparate durch die Pharmakopoea vorgeschrieben. Die Experimente, über die hier berichtet wird, befassen sich mit der Möglichkeit, dasselbe Ziel oder sogar noch weitergehende und reproduzierbarere Resultate zu erhalten, als dies mit dem Rattenuterus möglich ist.

Aus Schlachthofmaterial werden Uterus-Muskelzellen (Myometriumzellen) gewonnen und ihre Interaktion mit Oxytocin untersucht (Gleichgewichtsstudien und Zeitabhängigkeit der Bindung des Hormons an die Zelloberfläche, Inositolphosphatbestimmungen). Ausserdem wurde eine Methode entwickelt, um die Bindung des Hormons in kürzesten Zeitabständen zu erfassen.

E I N L E I T U N G

Oxytocin ist ein Peptidhormon, das bei der Geburt die Wehen auslöst. Deshalb können zu schwache Wehen durch Oxytocin-Gaben verstärkt werden.

Gemäss der europäischen Pharmakopoea (1) sind zur Testung von Neurohypophysenpräparaten zwei verschiedene Tierversuche vorgeschrieben: 1. Testen der Substanz durch Absinken des Blutdrucks beim Huhn. Wird das Tier gegenüber den wiederholten Injektionen der Substanz unempfindlich, ist es für den Versuch ungeeignet und durch ein anderes Tier zu ersetzen (1), 2. Kontraktionsmessungen am Rattenuterus in vitro. Mit Hilfe von Oestrogenen wird eine Ratte in den gewünschten Zykluszustand versetzt, in dem der Uterus hochsensibel gegenüber Oxytocin reagiert. Die Ratte wird getötet und die Uterushörner werden in ein Organbad eingehängt. Spontane Kontraktionen des Uterus dürfen nicht auftreten und das Präparat muss seine Empfindlichkeit behalten; bei Nichterfüllung dieser Bedingungen muss ein anderer Uterus benützt werden. Nun erfolgt die Zugabe verschiedener Dosen der Test- bzw. der Vergleichslösung und das Messen der Kontraktionen (1). Diese Methode wird der Methode "Blutdruckmessung bei Hühnern" vorgezogen (2).

Mit der vorliegenden Arbeit wird versucht, die Versuche am Rattenuterus durch Zellkulturen zu ersetzen. Der Vorteil von Zellkulturen liegt nicht nur darin, dass Tiere eingespart werden können sondern auch, dass direkt mit den Oxytocin-sensiblen Zellen gearbeitet werden kann. Ein Organ besteht aus verschiedenen Zellpopulationen und es ist zu erwarten, dass Tests mit Zellkulturen aussagekräftiger, vor allem hinsichtlich eines Screenings für neue Substanzen, sind. Das beinhaltet folgende Fragestellungen: Reagieren

die Zellen auf Oxytocin?, wenn ja, wie reagiert die Zelle auf die Einwirkung von Oxytocin? Gibt es typische Reaktionen der Zelle, die für die Einwirkung von Oxytocin charakteristisch sind? Können diese Reaktionen zur Standardisierung der Zelle verwendet werden?

ZUM WIRKUNGSMECHANISMUS VON OXYTOCIN

Oxytocin wird im Hypothalamus gebildet und der Neurohypophyse zugeführt. Es greift vor allem an den glatten Muskelzellen an. Das Oxytocin bewirkt das Einschiessen der Milch durch Kontraktion der Myoepithelzellen der Drüsenalveolen; besonders empfindlich ist vor allem der östrogendominante Uterus.

Wenn sich ein Peptidhormon (z.B. Oxytocin) an einen Rezeptor an der Zelloberfläche bindet, bildet die Zelle sogenannte "second messengers", die die Botschaft des Hormons weitervermitteln. Die Inositolphosphate stellen einen solchen "second messenger" dar (Fig. 1). Die Inositolphosphate bewirken in der Zelle eine Kalziumausschüttung aus dem endoplasmatischen Retikulum, um der Zelle Kalzium zur Verfügung zu stellen (z.B. zur Kontraktion).

MODELLVORSTELLUNG DES WIRKUNGSMECHANISMUS VON OXYTOCIN

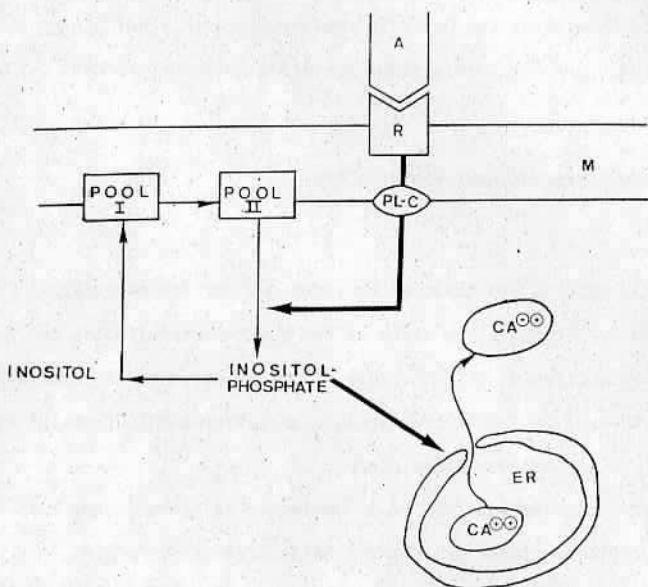


Fig. 1 Der Wirkungsmechanismus des Oxytocins besteht in der Freisetzung von Inositolphosphaten. Ein Teil des Membranpools der Inositolphosphate (Pool I) wird phosphoryliert (Pool II). Der Agonist (A, z.B. Oxytocin) stimuliert durch den Rezeptor (R) die Hydrolyse der Inositolphosphate aus Pool II durch eine Phospholipase (PL-C). Dadurch entstehen die Inositolphosphate, die aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) der Zelle Calcium mobilisieren können ("second messenger").

Die entstandenen Inositolphosphate werden durch Dephosphorylierung in freies Inositol umgewandelt, das zur Neusynthese von Inositolphosphaten (Pool I) zur Verfügung steht (Inositolphosphatzyklus).



METHODEN UND MATERIAL

Die Zellkulturherstellung erfolgt aus Schlachthofmaterial. Am besten sind frische Uteri vom Schaf geeignet, im ersten Zyklus des erwachsenen Tieres. Die beiden Gewebsschichten (Endometrium und Myometrium) sind bei jungen Schafen noch nicht so stark verwachsen, sodass die Muskelschicht (Myometrium) leicht mechanisch abzutrennen ist. Aus einem Uterus können zwei bis vier Primärkulturen hergestellt werden. Die Zellzahl der frisch isolierten Zellen beträgt zwischen hunderttausend und im besten Fall eine Million Zellen. Die Kulturen sind innert einer Woche konfluent. Pro Kulturflasche kann mit ca. einer Million Zellen gerechnet werden. Diese Menge an Zellen ist die Mindestanzahl für ein Bindungsexperiment mit Oxytocin. Die Brauchbarkeit der Zellkultur liegt zwischen zwei und drei Wochen. Die Zellen werden sobald als möglich in Experimenten weiterverarbeitet. Im Jahresdurchschnitt wurden jede Woche Zellkulturen angelegt. Da es sich um Schlachthofmaterial handelt, ist die Kontaminationsgefahr mit Bakterien oder Pilzen sehr gross. Diese Probleme sind jedoch meistens mit Hilfe von Antibiotika sowie Antimykotika zu beheben.

Sofort nach der Entnahme aus dem Tier (Schaf oder Rind) wird der Uterus gekühlt. Zwei Gewebsschichten des Uterus können leicht getrennt werden: 1. Das Endometrium, das den bekannten zyklischen Veränderungen unterliegt. 2. Das Myometrium, Angriffsort des Oxytocins bei uterinen Kontraktionen. Das Myometrium wird aus dem Uterus herauspräpariert und durch enzymatische Gewebeerweichung wird das Gewebe in Einzellzellen dissoziiert (3). Um Fibroblasten zu eliminieren, erfolgt ein sogenanntes "Preplating" der frisch angesetzten Zellkultur: Fibroblasten haften schneller als Muskelzellen in der Kulturschale und

setzen sich daher innert einer Stunde ab (4). Der Ueberstand, der die Muskelzellen enthält, wird frisch kultiviert. Die Kultivierung der Zellen erfolgt in Zellkulturflaschen oder auf 24er Zellkulturplatten. Als Medium wird HAM'S F-10 (Seromed) plus 10 % Foetales Kälberserum verwendet.

Um die Zellen in den 24er Zellkulturplatten zu kultivieren, müssen die Zellen mit Trypsin aus der normalen Kulturflasche abgelöst und neu eingesät werden. Primärkulturentwicklung in den 24er Platten war bisher noch nicht möglich. Die Zellen können tiefgefroren werden. Es ist jedoch noch nicht klar, ob die Rezeptoren für Oxytocin durch das Tiefgefrieren beschädigt werden.

Fibroblasten und Myometriumzellen sind lichtmikroskopisch nicht zu unterscheiden. Zum Nachweis, dass es sich um Muskelzellen handelt, wurde eine immunhistochemische Methode herangezogen. Die Intermediärfilamente glatter Muskelzellen enthalten Desmin, ein Protein, das in Fibroblasten nicht vorkommt. Mit Hilfe von monoklonalen, fluoreszierenden Antikörpern können die desminhaltigen Intermediärfilamente sichtbar gemacht werden (5).

Es zeigte sich, dass die hergestellten Zellkulturen ca. 50 % glatte Muskelzellen enthalten (Fig. 2).



Fig. 2a
Zellkultur (40x)

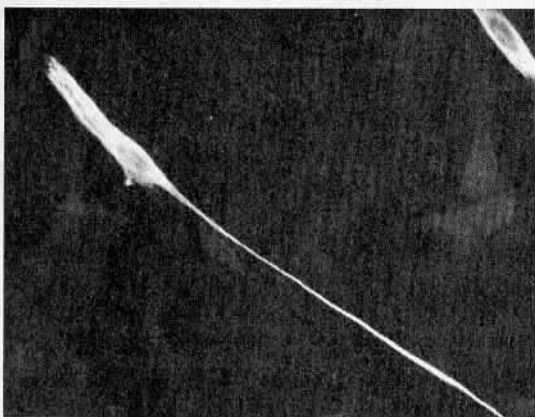


Fig. 2b
Wie 2a. Fluoreszenz-
mikroskopische
Aufnahme.
Die fluoreszierenden
Zellen sind glatte
Muskelzellen und
haben mit dem Anti-
körper reagiert.

Schon früher wurden die Rezeptoren auf den Uteruszellen an unserem Institut untersucht. Die Rezeptorstudien erfolgten an dissoziierten Zellen, die mit radioaktiv markiertem Oxytocin inkubiert wurden. Durch Zentrifugation wurde an die Zellen gebundenes Oxytocin von freiem Oxytocin getrennt. Die Bindungseigenschaften der Zelle wurden aus den Resultaten der Experimente mit Hilfe eines geeigneten Computerprogramms berechnet (6). Nachdem festgestellt wurde, dass die Zellen Rezeptoren für Oxytocin besitzen, wurden zum Studium des Zeitverlaufs der Bindung zwei neue Methoden eingeführt: 1. Trennung der dissoziierten Zellen von freiem Oxytocin durch Membranfiltration (Millipore). 2. Trennung der Zellen von freiem Oxytocin durch sofortiges Absaugen der Inkubationslösung. Dieses Experiment wurde direkt auf den 24er Zellkulturplatten durchgeführt (7,8). Wegen den kurzen Zeitabständen ist es nicht vorteilhaft, mit der Zentrifugationsmethode (wie bei den Rezeptorstudien) zu arbeiten.

Die Bestimmungen der Inositolphosphate werden folgendermassen durchgeführt: Inkubation der Zellen mit ³(H)Inositol, Zugabe von Lithiumchlorid zur Unterbrechung des Inositolphosphatzyklus, Inkubation der Zellen mit Oxytocin in verschiedenen Konzentrationen. Die Analyse erfolgt schrittweise durch Eluierung von Ionenaustauschssäulen und anschliessender Scintillationsmessung. Zu dieser Bestimmung müssen die Zellen auf den 24er Zellkulturplatten kultiviert werden (9).



RESULTATE UND DISKUSSION

gegenwärtiger Stand

Das Gelingen der Kultur hängt sehr vom Ausgangsmaterial ab. Die Kultivierbarkeit der Zellen hängt von der Jahreszeit ab, in der die Kulturen angelegt werden. Die Kulturen wurden während zwei Jahren beobachtet: es ergab sich der Trend, dass die besten Kulturen in den Monaten April bis August angelegt werden können. Im Herbst ist es meistens nicht möglich. Wir vermuten einen Zusammenhang mit der sexuellen Aktivität des Schafs. Das Schaf, ein Tier mit saisonalem Geschlechtszyklus, hat während den Herbstmonaten sein Brunstzeit (abnehmende Tageslänge, Fig. 3). Die damit einhergehenden Veränderungen des Uterusgewebes (erhöhter Um- und Abbau des Endometriums) beeinträchtigen die Kulturherstellung vor allem bezüglich der Anhaftung der Zellen an die Kulturschale. Die Bewertungsstufen 2, 3 und 4 der Zellkulturen sind Kulturen, die zur Testung von Oxytocin eingesetzt werden können; sie werden innert 7 bis 10 Tagen konfluent. Bei den Bewertungsstufen 0 und 1 haften die meisten Zellen nicht an der Kulturschale an (Fig. 4). Diese Beobachtungen decken sich auch mit den Erfahrungen bei der Herstellung von Myometriumzellen aus Rindermaterial. Es wurden insgesamt 52 Kulturen angelegt, von denen sich keine befriedigend entwickelt hat. Das Rind, ein Tier mit asaisonalen Geschlechtszyklus, hat einen Zyklus von 21 Tagen. Auch hier ist die Ursache bei den zyklischen Veränderungen des Uterusgewebes zu suchen. Die Zellen haften ebenfalls nicht an der Kulturschale an.

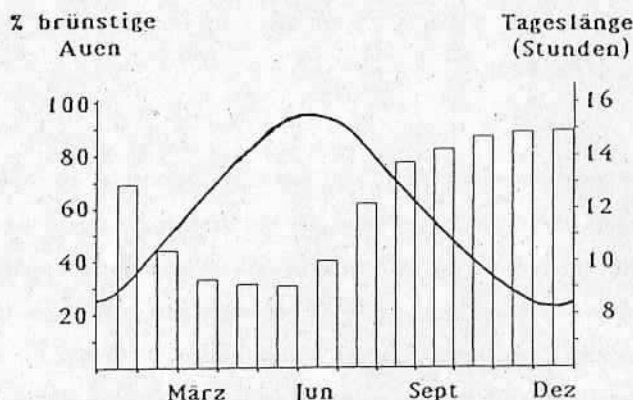


Fig. 3 Veränderung der sexuellen Aktivität (Säulen) schweizer Auen (Mutterschafe) in Abhängigkeit von der Tageslänge

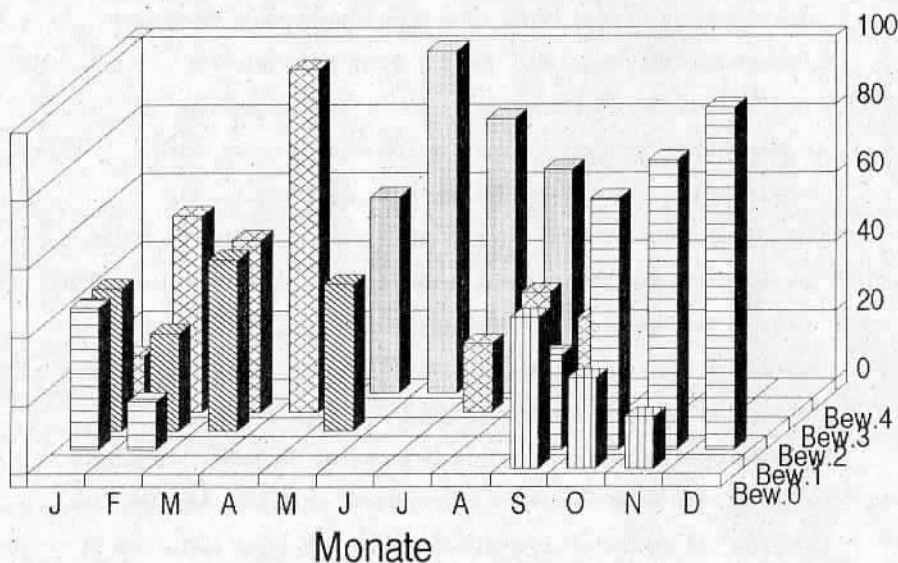


Fig. 4 Brauchbarkeit der Zellkulturen im Jahresschnitt. Die Bewertungsstufen 2,3, und 4 der Zellkulturen sind Kulturen, die zur Testung von Oxytocin eingesetzt werden können (s. Text). Die Zahlen 0 bis 100 sagen aus, wieviel Prozent der Kulturen einer bestimmten Bewertungsstufe zugeordnet werden können.

Durch frühere Experimente (10) wurden die Bindungsstellen der Zellen für Oxytocin bereits nachgewiesen und charakterisiert. In dieser Arbeit wurde der Zeitverlauf der Bindung untersucht, wobei sich die Methode der Membranfiltration nicht bewährt hat. Die Membranen selbst binden Oxytocin, und es war nicht möglich, diese unspezifische Bindung zu erniedrigen. Deshalb wurde die Methode mit anhaftenden Zellen auf den 24er Zellkulturplatten entwickelt. Die Methode hat den Vorteil, dass die Zellen vor dem Experiment nicht mehr mit einem Enzym abgelöst werden. Die Experimente werden direkt auf den 24er Zellkulturplatten durchgeführt und ein regelmässiger Zeitverlauf wurde nachweisbar.

Leider hat sich gezeigt, dass die Zellen nicht vermehrt werden können, da die Zellen durch Passage die Rezeptoren für Oxytocin verlieren. Es können keine Reservezellen produziert werden. Auch wurde versucht, die Rezeptoren durch Zugabe von Oestradiol ins Inkubationsmedium zu induzieren, was jedoch nicht gelungen ist.

Der Wirkungsmechanismus des Oxytocins besteht in der Freisetzung von Inositolphosphaten. Dieser Sachverhalt konnte bei Vorversuchen an Aorta-Muskelzellen festgestellt werden. Es wurde nachgewiesen, dass Oxytocin bei drei Metaboliten des Inositolphosphats eine Erhöhung bewirkt. Bei den bisherigen Experimenten mit Myometriumzellen konnte nur eine leichte Erhöhung der Inositolphosphate festgestellt werden.

Die 24er Zellkulturplatten sind einfach zu handhaben und die Bindung des Hormons an die Zelloberfläche wäre ein Nachweis, dass die Zelle mit dem Hormon reagiert. Zur genaueren Abklärung des Wirkungsmechanismus und der Wirkung können zusätzlich die Inositolphosphate bestimmt werden. Diese Methode könnte ein erster Screening für uterotonische Substanzen darstellen.



L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- (1) EUROPÄISCHE PHARMAKOPOEA, 1978, derzeit gültig, Band III S. 317 u.S. 369ff
- (2) STUERMER, E. in "Neurohypophysial Hormones and Similar Peptides", Editor: B. Berde, Springer Verlag, Heidelberg, New York, 1968, S. 130-155, S. 443-469
- (3) VALLET-STROUVE, C. and MOWSZOWICZ, C., "Myometrial cells in primary culture: characterization and hormonal profile." Mol. cell. Endocr., 12, 97-110, 1978
- (4) CHAMLEY-CHAMPBELL, J., CAMPBELL and G.R., ROSS, R., "The smooth muscle cell culture." Physiol. Rev., 59, 1-61, 1979
- (5) VIRTANEN, I., KALLAJOKI, O., NAERVAENEN, N., PARANKO, J., THORNELL, L.E., MIETTINEN, N. and LEHTO, V.P., "Peritubular myoid cells of human and rat testis are smooth muscle cells that contain desmin-type intermediate filaments." The Anat. Record, 215, 10-20, 1986
- (6) und (7) ALEXANDROVA, M. and SOLOFF, M.S., "Oxytocin receptors and parturition. I und II. Endocrinology, 106, 730-735 (I), 736-738 (II), 1980
- (8) PENIT, J., FAURE, M., and JARD, S., "Vasopressin and angiotensin II receptor in rat aortic smooth muscle cells in culture." Am. J. Physiol., 244, E72-E82, 1983
- (9) BERRIDGE, M.J., "Inositol triphosphate and diacylglycerol as second messengers." Biochem. J., 220, 345-360, 1984
- (10) PLISKA, V., HEINIGER, J., MUELLER-LHOTSKY, A., and EKBERG, B.A., "Oxytocin receptors in sheep and rat myometrium." J. Steroid. Biochem. 20, 1505, 1984

ALBERT, MIT DEN UTERUSMUSKELZELLEN
STIMMT ETWAS NICHT...

