

DIE INTERAKTION DES NEUROHYPOPHYSENHORMONS OXYTOCIN MIT MYOMETRIALEN ZELLEN DES SCHAFS.

Experimente mit Zellkulturen als Ergänzung und
Alternative zu Versuchen an isolierten Rattenuteri?

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels eines
Doktors der Naturwissenschaften
der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE
ZÜRICH

vorgelegt von
HILDEGARD KOHLHAUF ALBERTIN
Dipl. Ing. Agr. der Universität Hohenheim
geboren am 26. April 1956
von Ettlingen/Karlsruhe

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. V. Pliška, Referent
Prof. Dr. G. Stranzinger, Korreferent

14.11.1988

V. Pliška

ADAG Administration & Druck AG

Zürich 1988

ABSTRACT

The rat uterus has been used for development of new medications for human and veterinary gynaecology and obstetrics. This *in vitro* model has also been prescribed by Pharmakopoea. Our experiments were conducted with the intention of obtaining the same goal, or even more extensive and reproducible results as those which are possible using the rat uterus. This research examined the bases for development of a test system using material obtained at the slaughterhouse. Muscle cells (myometrium cells) were prepared from uteri collected at the slaughterhouse, and their interaction with oxytocin was tested. It was demonstrated that the most suitable material is fresh uteri from sheep which have recently reached puberty. The uterus was cooled immediately after its removal from the carcass, then prepared in the laboratory as soon as possible. Two layers of tissue were easily separated from the uterus: the endometrium which is known to have cyclic changes, and the myometrium where oxytocin induces uterine contractions. After removal from the uterus, the tissue of the myometrium was enzymatically separated into single cells. Successful cell culture was dependent upon the material used and the time of year in which the cultures were started. Cultures were prepared over a period of three years: those initiated between the months of April and August tended to be the best. It is suspected that this is due to the sexual activity of sheep.

Smooth muscle cells can not be visually differentiated from fibroblasts in culture. As proof that the cultures contained muscle cells, an immunohistochemical method was utilized. The intermediate filaments of smooth muscle cells contain desmin, a protein which is not found in fibroblasts. Using fluorescing monoclonal antibodies, the intermediate filaments containing desmin became visible. Usually 50-80% of the cells in the cultures were muscle cells. Separation of fibroblasts from muscle cells by differential gradient centrifugation with Percoll was not successful, due to the similar densities of the fibers (1.002 and 1.005 g/ml, respectively).

Tritiated oxytocin and single cells were used to study the ability of oxytocin to bind to myometrial cells. The tested concentrations of oxytocin were between 10^{-11} and 5×10^{-4} M. Three binding sites for oxytocin were characterized earlier by Pliska et al., 1986. Experiments using different concentrations of magnesium indicated that binding is influenced by magnesium, however the effect is different at the various binding sites. The period of time required for binding of oxytocin to the cell membrane was examined using concentrations of oxytocin which varied from 10^{-11} to 5×10^{-7} M. Five different methods were compared during this examination: 1) use of single cells and subsequent centrifugation, 2) use of membrane filters from which free oxytocin is removed by vacuum pump; single cells are also used for this method, 3) use of single cells which are separated from the free oxytocin solution with phthalic acid ester prior to centrifugation, 4) use of plated cells grown on cell culture dishes with 24 wells; the free oxytocin solution is simply sucked-off, and 5) use of plated cells on glass microscope slides.

The effect of time is most obvious using method 5, which provides a very large number of cells to work with. The 24-well culture plates are simplest to handle, and with this method it is easiest to record the shortest difference in time. A peak in the time lapse within the first minute was found using each of the five methods. We suspect that inositolphosphate serves as a second messenger for the hormone, and causes the release of calcium within the cell. Of the three most important metabolites of inositolphosphate, inositoldiphosphate increased most distinctly. The concentration of inositoldiphosphate doubled under the influence of oxytocin. This increase was 1.5 times greater than for the control.

A system has been developed which can be used to test the mechanism of action of oxytocin. The 24-well culture plates are easy to handle and the binding of oxytocin to the cell surface was evidence that the cells reacted with the hormone. In addition, measurement of the concentration of inositolphosphate clarified the mechanism of signal transmission of oxytocin into the cell. This method could be used as an initial screening test for uterotonic substances.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Zur Entwicklung neuer Pharmaka für die Human- und Veterinärgynäkologie und -Geburtshilfe werden Experimente an isolierten Rattenuteri benützt. Diese Versuche sind auch durch die Pharmakopoea vorgeschrieben. Unsere Experimente befassen sich mit der Möglichkeit, dasselbe Ziel mit anderen Methoden zu erreichen. Diese Arbeit beschreibt einige Grundlagen, ein Testsystem aus Schlachthofmaterial zu entwickeln.

Aus Schlachthofmaterial werden Uterus-Muskelzellen (Myometriumzellen) gewonnen und ihre Interaktion mit Oxytocin untersucht. Frisch gewonnene Uteri vom Schaf sind gut geeignet, wobei der erste Zyklus des erwachsenen Tieres vorteilhaft ist. Sofort nach Entnahme des Uterus aus dem Tier wird der Uterus gekühlt und sobald als möglich im Labor präpariert. Zwei Gewebsschichten des Uterus können leicht getrennt werden: Das Endometrium und das Myometrium, der Wirkungsort des Oxytocins bei uterinen Kontraktionen. Das Myometrium wird aus dem Uterus herauspräpariert, und durch enzymatische Verdauung wird das Gewebe in Einzelzellen dissoziiert. Der Erfolg einer Kultur hängt vom Ausgangsmaterial ab. Die Kultivierbarkeit wird von der Jahreszeit, in der die Kulturen angelegt werden, stark beeinflusst. Die Kulturen wurden während drei Jahren regelmässig angelegt: die besten Kulturen konnten in den Monaten April bis August beobachtet werden. Ein Zusammenhang mit der saisonalen sexuellen Aktivität des Schafs kann vermutet werden.

In den Kulturen sind glatte Muskelzellen nicht visuell von Fibroblasten zu unterscheiden. Zum Nachweis und zur Differenzierung dieser Zelltypen wurde eine immunhistochemische Methode herangezogen. Die Intermediärfilamente glatter Muskelzellen enthalten Desmin, ein Protein, das in Fibroblasten nicht vorkommt. Mit Hilfe von fluoreszierenden, monoklonalen Antikörpern können die desminhaltigen Intermediärfilamente sichtbar gemacht werden. Die Myometriumkulturen enthalten in der Regel 50 - 80 % Muskelzellen. Es ist nicht gelungen, die Zellen mit Hilfe der differentiellen Gradienten-Zentrifugation mit Percoll zu trennen, da Fibroblasten und glatte Muskelzellen eine ähnliche Dichte haben, die zwischen 1,002 und 1,005 g/ml liegt.

Mit Bindungsstudien wurde der Einfluss verschiedener Konzentrationen von Magnesium auf die Bindung untersucht. Die Bindungsstudien für Oxytocin wurden an freien Zellen mit tritiiertem Oxytocin durchgeführt. Der Konzentrationsbereich lag zwischen 10^{-11} und 5×10^{-4} M ^3H -Oxytocin. Die drei bekannten Bindungsstellen wurden früher charakterisiert (Pliska et al 1986). Magnesium hat einen Einfluss auf die Bindung, der sich jedoch bei den verschiedenen Bindungsstellen unterschiedlich darstellt.

Die Zeitverläufe der Bindung von Oxytocin an die Zellmembran wurden im Konzentrationsbereich 10^{-7} - 5×10^{-7} M durchgeführt. Es wurden insgesamt fünf verschiedene Methoden miteinander verglichen: 1) mit freien Zellen und anschließender Zentrifugation 2) mit Membranfilter von denen das Medium mittels Vakuumpumpe abgesaugt wird; auch hier konnte mit freien Zellen gearbeitet werden 3) mit einer Methode, ähnlich der ersten Methode; die Zellen werden vor der Zentrifugation mit Hilfe von Phthalsäureester von der freien Oxytocinlösung getrennt 4) mit festgewachsenen Zellen auf 24er Zellkulturplatten; das Medium kann einfach abgesaugt werden 5) mit festgewachsenen Zellen auf Glasobjektträgern. Am deutlichsten ist der Zeiteffekt bei der Methode mit den Phthalsäureestern zu sehen, da mit sehr grossen Zellzahlen gearbeitet werden kann. Am einfachsten sind die 24er Zellkulturplatten zu handhaben, auch ist es hier am einfachsten, kürzeste Zeitabstände zu erfassen. Mit allen fünf Methoden lässt sich ein Peak im Zeitverlauf innerhalb der ersten Minuten nachweisen.

Wir vermuten, dass die Inositolphosphate dem Hormon als "second messenger" dienen, um in der Zelle eine intrazelluläre Calciumausschüttung auszulösen. Von den drei wichtigsten Metaboliten der Inositolphosphate zeigte das Inositoldiphosphat den deutlichsten Anstieg. Die Menge der Inositoldiphosphate verdoppelte sich unter dem Einfluss von Oxytocin. Der Anstieg der Gesamtinositolphosphate betrug das 1.5-fache der Kontrolle.

Die 24er Zellkulturplatten sind einfach zu handhaben und die Bindung des Hormons an der Zelloberfläche wäre ein Hinweis, dass die Zelle mit dem Hormon reagiert. Zusätzlich können noch, als weitere Stufe der Signalübertragung, die Inositolphosphate bestimmt werden. Diese Methode könnte ein erstes Screening für uterotone Substanzen darstellen.