

Doktori értekezés

PROLAKTIN BIOSZINTÉZIS A TERHES HUMAN

DECIDUÁBAN IN VITRO

Horváth Klára



S Z E G E D

1982



TARTALOMJEGYZÉK

	Oldal
1. BEVEZETÉS	1
1.1. Irodalmi előzmények	1
1.2. Célkitűzések	10
2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	11
2.1. Felhasznált vegyszerek és anyagok jegyzéke	11
2.2. Vizsgálati anyag	13
2.3. Decidua és chorion minták szövettani vizsgálata	13
2.4. Inkubációs módszer	14
2.5. Fehérjeszintézist gátló vegyület, illetve előzetes fagyasztás hatásának vizsgálata .	16
2.6. Sejtfrakciók preparálása	17
2.7. Szövethomogenizátumok fehérjetartalmának meghatározása	19
2.8. A minták prolaktinkoncentrációjának meghatározása	20
2.9. Az eredmények értékelése során alkalmazott statisztikai számítások	21
3. EREDMÉNYEK	22
3.1. Szövettani vizsgálatok	22
3.2. A prolaktin felhalmozódása az inkubációs pufferben	24
3.3. Fagyasztás hatása a decidua hormontermelésére	24
3.4. Sejtfrakciók prolaktintermelése	27

3.5.	Decidua által in vitro termelt prolaktin immunológiai specificitása	27
3.6.	Fehérjeszintézist gátló anyag hatása az in vitro hormontermelésre	30
3.7.	A decidua in vitro prolaktintermelésének változása a terhesség első trimeszterében	33
3.8.	Összefüggés a decidua prolaktintartalma és hormonszintetizáló képessége között . .	33
3.9.	A chorion in vitro prolaktintermelése . .	37
4.	MEGBESZÉLÉS	38
5.	ÖSSZEFOGLALÁS	46
6.	IRODALOM	48

1. BEVEZETÉS

1.1. Irodalmi előzmények

A nőgyógyászati endokrinológiai kutatásokban az utóbbi évtizedben rendkívül nagy jelentőségüvé váltak a prolaktinnal foglalkozó vizsgálatok. A hormon keletkezését, kibocsájtásának regulációját, fiziológiai hatásait és különböző patológiás kórképekben játszott szerepét népes kutató gárda tanulmányozza szerte a világon.

A prolaktin története kb. 50 éves multra tekint vissza. Az első időkben biológiai tesztekert használtak az akkor még ismeretlen hormon kimutatására. A radioimmun-analitika alapelvének kidolgozása és rutin módszerre válása felgyorsította az endokrin kutatásokat, a prolaktin-kérdés gyors fejlődéséhez azonban még bizonyos elméleti vonatkozások tisztázása is szükséges volt. A hormon önálló léte csak 1971-72-ben vált kétségtelenné, amikor Lewis és mtsai /1971/ valamint Hwang és mtsai /1972/ sikeresen izolálták a human prolaktint. Ennek alapján 1972-73-ban a heterológ és homológ radioimmun módszerek egész sorát dolgozták ki, megnyitva ezzel a human prolaktinkutatások szinte páratlan lendületét.

Ma a human prolaktinról tudjuk, hogy molekulasulya kb. 22000, és aminosav-szekvenciája rokon az egyéb emlős prolaktinokkal. Azonban újabb kutatások kimutatták, hogy a szérumban jelenlevő prolaktin nem egységes molekulasulyu /Suh és Frantz 1974; Rogol és Rosen 1974/, gél-kromatográfiával elkülöníthető ún. „kis” és „nagy” prolaktin, melyeknek immunreaktivitása azonos. A „kis” prolaktin megfelel a monomer formának, és ez képezi a vér prolaktintartalmának döntő többségét, azonban a „nagy” prolaktin aránya a terhesség során fokozatosan emelkedik. A két különböző méretű hormonmolekula létezésének oka és jelentősége még nem ismeretes.

A hormon szintézise és szekreciója a hipofízis mellső lebenyének sejtjeiben történik. Ezen sejtek funkciója számos stimuláló és gátló tényező befolyása alatt áll, melyek vagy hipotalamikusan szinten vagy a hipofízis szintjén érvényesülnek. A pontos reguláció felderítésének az a fő akadálya, hogy a prolaktinnak nincs saját célszerve, viszont a legkülönbözőbb szervekre van a legkülönbözőbb hatással. Eddig ezeknek kb. 80 féle változatát regisztrálták, s ezek is a vizsgált speciestől, a species nemétől és az alkalmazott dózistól nagyfokban függenek /infertilitás, folyadék- és elektrolitháztartás zavarai, májbetegségek, malignus tumorok, diabetes, hőreguláció stb/.

Hazai vonatkozásban kevesen foglalkoztak a kérdéssel. Jelentősek Kurcz és mtsai /1965/ vizsgálatai állatkísérletesen valamint metodikai vonalon, illetve Gáti és munkacsoportjának /1976/ megfigyelései a prolaktin-szerű aktivitás ciklusos változásaira vonatkozóan normálisan menstruáló nők vérében.

Klinikánkon kb. egy évtizede folyik intenzív kutató munka, melynek fő vizsgálati iránya a prolaktin szerepének tisztázása az infertilitás kialakulásában /Sas és mtsai 1978; Godó és mtsai 1979/.

A prolaktin normálértéke a szérumban 170-540 mU/l közt mozog. Szintje a terhesség során végig emelkedik, és kb. tízszer magasabb értéket ér el, mint nemterhes állapotban /Tyson és mtsai 1972/. Mai tudásunk szerint szerepe lehet a terhesség immunológiai toleranciájában, a burokrepedés előtti fájástevékenység blokkolásában, a magzatvizháztartás szabályozásában. Laktációban értéke végig magas, s ezt a szintet elsősorban a szoptatás mechanikus és pszichés stimulációja tartja fenn /Jaffe 1972; Bryant 1971/. A magzatviznek hasonlóan nagy immunreaktív prolaktintartalma van. Korai terhességben 100-szor, terminusban pedig 5-10-szer magasabb a magzatviz prolaktinkoncentrációja, mint a megfelelő anyai vagy magzati szérumszint /Hwang és mtsai 1971; Schenker és mtsai 1975/.

A magzatviz-prolaktinról bebizonyosodott, hogy fizikai-kémiai,biológiai és immunológiai tulajdonságait tekintve azonos a hipofízis-prolaktinnal /Ben-David és Chrambach 1977;Ben-David és mtsai 1973;Rathnam és mtsai 1977/,azonban eredete és élettani funkciója a legutóbbi időkig ismeretlen volt, és máig sem teljesen tisztázott kérdés.

Elméletileg a magzatvizben található nagy mennyiségű prolaktinnak három forrása lehet:

- 1/ magzati hipofízis
- 2/ placenta
- 3/ anyai hipofízis

Mivel a terhesség első trimeszterében már jelentős mennyiségű prolaktin található a magzatvizben,az első lehetőség kizárható,mert ekkor még a fetalis hipofízis nem vagy csak nagyon kis mennyiségben termel prolaktint.

A hipofízisen kívüli prolaktinszintézis lehetőségét először Friesen és mtsai vetették fel 1972-ben, miután ^{125}I -prolaktint juttatva terhes majmok keringésébe izotópot nem tudtak kimutatni sem a magzatvizben, sem a fetusban, illetve a jelzett hormont a magzati keringésbe adva nem tapasztalták annak átjutását az amniotikus folyadékba.Ezt a hipotézist támasztja alá Walsh és mtsai /1977/ megfigyelése,akik Rhesus majmokkal végzett

kísérleteik során úgy találták, hogy sem az anyai hipofizectomia, sem a fetalis halál nem befolyásolja a magzatvíz prolaktintartalmát.

A hipofizisen kívüli prolaktinszintézis helyét keresve, Riddick és Kusmik /1977/ a feto-placentáris egység szöveteit vette vizsgálat alá. Kiindulási alapul szolgáltak azok az ismert tények, melyek szerint a decíduában intenzív fehérjeszintézis folyik már néhány órával a decíduális átalakulás kezdete után, illetve a placentában történik több szteroid- és proteohormon /human choriális gonadotropin, human placentáris laktogén, ösztrogének, gesztogének/ termelése és kibocsájtása.

A továbbiakban szükségesnek látszik ezen szövetek definiálása, és felépítésének valamint funkciójának rövid ismertetése.

Megtermékenyítés után a méh nyálkahártyájában, az endometriumban jelentős változások zajlanak le a progeszteron és az ösztrogének hatására, amely így alkalmassá válik a megtermékenyített pete befogadására. A kialakuló gesztációs endometriumot nevezzük decíduának. Jellemzője az erős hipertrófizáltság és bőven szecernáló mirigyparenchyma. A decidua-sejt elnevezés specifikusan a terhes endometrium stromasejtjeire vonatkozik, melyek megnagyobbodottak, kerekké váltak, citoplazmájuk világos, és azt átlátszó membrán határolja.

A megtermékenyített petesejtben a differenciálódás során kialakul a trofoblaszt, amely az osztódó petesejt falát alkotja, és amelyből a beágyazódás után képződik a chorion. A további fejlődés során kialakuló sima chorion lemez a magzatburok részét képezi, a chorionbolyhokból pedig a méhlepény vagy placenta magzati része jön létre.

A belső magzatburkot amnionnak nevezzük, amely vékony kötőszövet-réteggel tapad a chorionhoz, a külső magzatburokhoz.

Riddick és Kusmik /1977/ terminusból származó /a terhesség 37-42. hete idején lezajlott szülés után nyert/ szövetmintákkal végzett kísérleteik alapján megállapították, hogy az amnion, chorion és decidua közül csak a decidua képes in vitro prolaktintermelésre. Számitásaik szerint a decidua hormonszintetizáló kapacitása biztosítani tudja a magzativizben mérhető prolaktinkoncentrációt.

Későbbi munkájukban Riddick és mtsai /1978/ valamint Golander és mtsai /1979/, Healy és mtsai /1979/ reprezentatíven bizonyították a prolaktin de novo szintézisét szintén terminusból származó deciduaminták inkubálása során: fehérjeszintézist gátló vegyületek /cikloheximid, puromycin/ dózisfüggően csökkentették a prolaktintermelést; ³H-leucinnak az inkubációs elegyhez

történő hozzáadása esetén prolaktin-antiszérummal precipitálható radioaktív hormon keletkezett. A szintetizált prolaktin azonosnak bizonyult a hipofízis-prolaktinnal gélkromatográfiásan, elektroforetikusan, immunológiai és receptor analitikai technikával /Golander és mtsai 1978; Frame és mtsai 1979/.

A magzatviz-prolaktin hipofízisen kívüli eredetét bizonyítja egy bromokriptin terápia mellett kihordott terhesség esete is /Bigazzi és mtsai 1979/. Az asszonyt hiperprolaktinémia miatt kezelték bromokriptinnel, amely gátolja a hipofízis prolaktintermelését. A terhesség bekövetkezése után folytatták a terápiát, s ennek következtében az anyai és magzati szérum-prolaktin alacsony szinten maradt a terhesség során. Ezzel szemben a magzatviz prolaktintartalma a normális terhességnek megfelelő nagy koncentrációt ért el, ami bizonyítja, hogy ennek forrása nem a hipofízis, és regulációja is más mechanizmussal történik, mivel a bromokriptin jelenléte nem csökkentette a hormon hipofízisen-kívüli szekrécióját.

A terhesség harmadik trimeszterében erős korrelációt találtak a magzatviz prolaktinkoncentrációja és a decidua prolaktinszintetizáló képessége között /Rosenberg és mtsai 1980/. Hasonló összefüggés volt kimutatható a decidua inkubálás előtti hormontartalma és

a szövet prolaktintermelő kapacitása között. Mivel mind a magzatviz, mind a decidua prolaktintartalma, illetve a decidua szintetizáló képessége csökkent a terminus felé /27-től a 40. hétig/, úgy tűnik, hogy a magzatviz prolaktinszintje a decidua hormontermelő kapacitásától függ.

Korai gesztációs időszakra vonatkozóan Maslar és mtsai /1980/ végeztek vizsgálatokat, és megállapították, hogy 2-6 hetes terhességből származó decíduális szövetek prolaktintermelése rohamosan növekszik, ahogy az implantáció előrehalad. Nem találtak különbséget a méhen belüli és a méhen kívüli terhességből nyert decíduaminták prolaktintartalma, illetve hormonszintetizáló képessége között. Az utóbbi esetben a decidua nem tartalmazott fetális eredetű szöveteket, tehát a prolaktintermelés teljes mértékben a decíduának tulajdonítható, nem pedig a fetális membránoknak vagy choriális szöveteknek.

Mivel az endometriumban terhesség nélkül is, hormonális hatás következtében predecíduális átalakulás következik be a menstruációs ciklus utolsó napjaiban, Maslar és mtsai /1979/ tanulmányozták a normális menstruációs ciklus endometriumának prolaktinszintézisét. A ciklus utolsó napjaiban fokozatosan növekedett a szövetek prolaktintermelése, ami a 28-1. napokon a két hetes vagy ennél korábbi terhes endometrium hormonszintetizá-

ló képességével volt összemérhető.

A terhesség első trimeszteréből /6-12 hét/ származó decídua és chorionboholy immunreaktív-prolaktintartalmát határozták meg Kubota és mtsai /1981/. A hormonkoncentráció a 8. hétig növekedett a decíduában, majd ettől kezdve nem mutatott szignifikáns változást. A chorionboholy prolaktintartalma, bár lényegesen alacsonyabb volt a decíduánál, szintén fokozatosan növekedett, és a 10. héten érte el maximális értékét. A hormon in vitro szintézisét egy 12 hetes terhességből származó szövetminta 2 órás inkubálásával vizsgálták. A chorionboholy prolaktinkibocsájtása az inkubációs közegbe mindössze 3%-a volt annak, mint amit a decídua esetén mértek. Azonban Riddick és mtsai /1978/ már korábban ki-mutatták, hogy a 24 órás inkubáció első három órájában a pufferben felhalmozódó prolaktin a szövet kiindulási hormontartalmának felel meg. Csak az ezután kibocsájtott prolaktin képezi az adott körülmények között de novo szintetizált hormont. Így tehát Kubota és mtsai /1981/ eredményei csak a decídua, illetve chorion prolaktintartalmára adhatnak felvilágosítást, nem pedig az in vitro szintézisre.

Ennek alapján kezdtük tanulmányozni a terhesség első trimeszteréből származó decíduális és choriális szövet prolaktintermelését in vitro körülmények között.



1.2. Célkitűzések

Vizsgálataink során célul tűztük ki:

- 1/ A human decidua in vitro prolaktinszintetizáló képességének vizsgálatát in vitro rendszerben a terhesség első trimeszterében
- 2/ Annak megállapítását, hogy van-e összefüggés a decidua kiindulási prolaktintartalma és hormonszintetizáló képessége között
- 3/ A choriális szövet prolaktintartalmának meghatározását és hormontermelésének tanulmányozását
- 4/ Az in vitro prolaktintermelés de novo jellegének igazolását azáltal, hogy kimutatjuk fehérjeszintézist gátló anyagnak a hormontermelést csökkentő hatását
- 5/ Annak vizsgálatát, hogy az in vitro szintézis ép, élő sejtstrukturát igényel, vagy valamely sejtalkotórészben lokalizálódik úgy, hogy a szintézis az elkülönített sejtfrakcióban is végbemegy.

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1. Felhasznált vegyszerek és anyagok jegyzéke

Reanal Finomvegyszergyár, Budapest:

Dinátriumhidrogénfoszfát Sörensen szerint /a.lt./

Eozin

Etilalkohol vízmentes /a.lt./

Fenolvörös indikátor

Formalin

Glükóz /a.lt./

Hematoxin

Kálciumklorid vízmentes /a.lt./

Káliumdihidrogénfoszfát Sörensen szerint /a.lt./

Káliumklorid /a.lt./

Káliumnátriumtartarát /a.lt./

Magnéziumklorid krist. /a.lt./

Magnéziumsulfát /a.lt./

Nátriumdihidrogénfoszfát /a.lt./

Nátriumhidrogénkarbonát /a.lt./

Nátriumhidroxid /a.lt./

Nátriumkarbonát vízmentes /a.lt./

Nátriumklorid /a.lt./

Paraffin, szilárd

Réz/II/-szulfát krist. /a.lt./

Thiomersal /Merthiolate, a.lt./

Egyéb:

Albumin,bovine /crystallized lyophilized,Sigma Chemical Co.,Saint Louis,U.S.A./

Fetalis borju szérum /Humán Oltóanyagtermelő és Kutató-intézet,Budapest/

Folin-Ciocalteu fenolreagens /E.Merck A.G.,Darmstadt, B.R.D./

Nitrogén, folyékony /József Attila Tudományegyetem, Szeged,Fizikai Tanszék/

Penicillin injekció 1000000 NE /Biogál Gyógyszergyár, Debrecen/

Puromycin Dihydrochloride /Nutritional Biochemicals Corporation,Cleveland,Ohio,U.S.A./

Prolaktin-standard /WHO RIA reagent programme,Wellcome, England/

Prolaktin-antiszérum /WHO RIA reagent programme, Wellcome,England/

Prolaktin-"second antibody" /WHO RIA reagent programme, Wellcome,England/

¹²⁵I-prolaktin /WHO RIA reagent programme, Wellcome, England/

Streptomycin sulfate pro.injekció /Szovjetunió/

95% oxigén, 5% széndioxid gázelegy /Oxigén és Dissous-Gázgyár Vállalat,Budapest/

2.2. Vizsgálati anyag

Vizsgálatainkhoz első-trimeszterbeli terhességmegszakítások során nyert szöveteket használtunk. A kísérletsorozatban csak fiziológiás terhességek művi megszakításával /Hegar dilatáció és curettage/ kapott minták szerepeltek, vagyis a patológiás okok miatt, illetve prosztaglandinnal végzett terhességmegszakításokat nem vettük be a vizsgálatba. A terhesség korát a legutolsó normális menstruáció idejéből számítottuk. A szövetek egyrészét szövettani vizsgálatra eltettük, a maradékot pedig az inkubációs kísérletekhez használtuk.

2.3. Decidua- és chorionminták szövettani vizsgálata

A műtét alkalmával nyert szöveteket steril, hideg fiziológiás sóoldattal mostuk, majd a szövettani vizsgálatra szánt mintákat 4% formalin-oldatba helyeztük. Huszonnégy óra elteltével az anyagokat alkoholos kezelés után paraffinba ágyasztuk, majd 5 μ m-es metszeteket készítettünk. Ezeket hematoxilinnel és eozinnal festettük mikroszkópos vizsgálat céljából. A statisztikai értékelésben csak azokat a mintákat vettük figyelembe, amelyek a szövettani vizsgálat alapján csak deciduális, illetve csak choriális szövetet tartalmaztak.

2.4. Inkubációs módszer

Kísérleteinkhez Riddick és mtsai /1978/ közleményében leírt módszert adaptáltuk, akik terminusból származó szövetminták hormonszintézisét vizsgálták, korai terhességmegszakításokból nyert decíduára és chorióra. A műtétek után a szöveteket azonnal steril, hideg fiziológiás /0,9%/ sóoldatba helyeztük, háromszor mostuk, majd apró darabokra vágtuk, és 0,5 g-os részekre osztottuk. A mintákat 50 ml-es Erlenmayer lombikokba tettük, és 20 ml Gey's puffert mértünk az edényekbe, ami 100 U/ml penicillint, 100 µg/ml streptomycint és 20% fetalis borjú szérumot tartalmazott /Porterfield 1960/. Luciano és mtsai /1980/ kimutatták, hogy aminosavszubsztrátot biztosító fehérje hozzáadása esetén szignifikánsan növekszik a hormon in vitro szintézise.

A puffer összetétele a következő:

A törzsoldat:

70,0	g	NaCl
3,7	g	KCl
1,5	g	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
0,237	g	KH ₂ PO ₄
10,0	g	glükóz
100,0	ml	fenolvörös /0,1%/

ioncserélt desztillált vízzel 1000 ml-re kiegészítve.

B törzsoldat:

0,42 g $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$

0,14 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$

0,34 g CaCl_2

1,00 ml fenolvörös /0,1%/

ioncserélt desztillált vízzel 100 ml-re kiegészítve.

C törzsoldat:

2,25 g NaHCO_3

1,00 ml fenolvörös /0,1%/

ioncserélt desztillált vízzel 100 ml-re kiegészítve. Az oldat pH-ját 7,9-re állítottuk széndioxid-átbuborékolatással.

Mindhárom törzsoldatot 118°C -on 1 atm tulnyomáson sterilizáltuk 20 percig. Az A törzsoldatot felhasználás előtt 1:9 arányban steril desztillált vízzel higitottuk. Az inkubációhoz alkalmazott puffert közvetlenül a vizsgálatok előtt 5% B oldatból, 5% C oldatból és 90% higitott A oldatból állítottuk össze; pH = 7,4.

A szövetmintákat és puffert tartalmazó lombikok egyrészét -40°C -ra fagyasztottuk. Ezek szolgáltatták később a kontrollértékeket a decidua kiindulási prolaktinkoncentrációjának meghatározásával. A többi lombik légterét 95% oxigén és 5% széndioxid gázeleggyel teltettük, majd az edényeket gumidugóval szorosan zártuk,

és 37°C-os vízfürdő's rázógépbe /Vibrotherm, Labor MIM/ helyeztük. Az inkubálást 24 óráig folytattuk, miközben 3 ; 6 és 20 óra elteltével 0,5 ml mintát vettünk, és egyuttal a fenti gázeleggyel újból telítettük a lombikok légterét /később a hormonkoncentráció számítása során a kivett térfogatoknak megfelelően korrigáltuk az eredményeket/. Huszonnégy óra elteltével a szöveteket 0°C-on homogenizáltuk Ultra-Turrax /IKA WERK/ homogenizátorral az inkubációs pufferben, majd 900 x g-n centrifugáltuk hűthető centrifugában /Janetzki K-24/. A felüluszt -40°C-on tároltuk, melyből később radioimmun módszerrel meghatároztuk a prolaktin koncentrációját.

A hormonnak a pufferben való felhalmozódását 32 óráig folytatott inkubációs kísérletekkel tanulmányoztuk. Ekkor 3 ; 6 ; 20 ; 24 ; 28 és 32 óra elteltével vettünk mintát a médiumból, egyébként az inkubálást a fentivel azonos körülmények között végeztük.

2.5. Fehérjeszintézist gátló vegyület, illetve előzetes fagyasztás hatásának vizsgálata

Fehérjeszintézist gátló vegyület hatását a decida prolaktintermelésére 8 hetes terhességből származó szövetminták inkubálása során vizsgáltuk. Az inkubáció megkezdése előtt a 0,5 g szövetet és 20 ml puffert

tartalmazó inkubátumokhoz 200 µl puromycin-oldatot, illetve desztillált vizet adtunk. A puromycin vég-koncentrációja 0,1 ; 1,0 ; 10 és 100 µg/ml volt. Az inkubációs médiumokból 3 ; 6 ; 18 és 24 óra időpontokban mintákat vettünk, és meghatároztuk prolaktintartalmukat. Külön kísérletet végeztünk 100 µg/ml vég-koncentrációju puromycint tartalmazó, illetve puromycin nélküli inkubátumok prolaktinszintézisének összehasonlítására. A pufferből a fenti időpontokban mintát vettünk, majd 24 óra után a szöveteket homogenizáltuk, és centrifugálás után mértük a felüluszó prolaktintartalmát.

Tanulmányoztuk a fagyasztás hatását a szövetek hormonszintetizáló képességére. Ugyanazon terhességmegszakításból származó decidua egyrészét azonnal a műtét után felhasználtuk a kísérletekhez, másik részét pedig fiziológiás sóoldattal történő mosás után folyékony nitrogénben -195°C -ra fagyasztottuk. Ezeket a mintákat egy héttel később azonos körülmények között inkubáltuk, homogenizáltuk, majd mértük a felüluszó prolaktinkoncentrációját.

2.6. Sejtfrakciók preparálása

Vizsgáltuk továbbá, hogy a decidua prolaktin-termeléséhez ép, élő sejtstruktúra szükséges-e, vagy a

szintézis egy sejtalkotórészben lokalizálódik, amely elkülönítve is képes a hormon szintézisére. A kérdés tanulmányozásához egy előzetes kísérletet végeztünk, melynek során csak a cytosol és nyers membrán frakciót választottuk szét ultracentrifugával történő szeparálással.

A kísérletekhez 4 g nyolc hetes terhességből származó szövetet 15 ml Gey's pufferben, mely nem tartalmazott fetalis borju szérumot, homogenizáltunk 0°C -on 2×30 másodpercig, majd $900 \times \text{g}$ -n centrifugáltuk hűtött centrifugában 20 percig. A felüluszó /teljes homogenizátum/ egyrészét inkubálásra félretettük, a maradékot Beckman Spinco ultracentrifugában $40000 \times \text{g}$ -n 20 percig centrifugáltuk. A felüluszt /cytosol frakció/ inkubálásra vittük, az üledéket pedig /nyers membrán frakció/ 10 ml Gey's pufferben Potter-Elvehjem teflonbetétes homogenizátorral 0°C -on 20 másodpercig reszuszpendáltuk, és ezután használtuk inkubálásra. Az inkubáció előtt minden frakcióból mintát tettünk el -40°C -ra fagyasztva, a fehérjetartalom, illetve a kiindulási prolaktinkoncentráció meghatározása céljából.

Az inkubáció során igyekeztünk biztosítani azokat a körülményeket, melyek közt az ép decíduális szövetet inkubáltuk, ezért a frakciók adott térfogatát 20 ml-re egészítettük ki fetalis borju szérumot tartalmazó Gey's pufferrel. A felhasznált mintamennyiséget úgy

választottuk meg, hogy az inkubációs elegy fehérjetartalma közelítőleg megegyezzen az intakt szövet inkubálása esetén mért fehérjekoncentrációval. Huszonnégy óra elteltével az inkubátumokat -40°C -ra fagyasztottuk, és később prolaktintartalmukat meghatároztuk.

2.7. A szövethomogenizátumok fehérjetartalmának meghatározása

A centrifugálás, illetve ultracentrifugálás során nyert frakciók fehérjetartalmát Lowry és mtsai /1951/ módszerével határoztuk meg. A minták $100\ \mu\text{l}$ térfogatához lugosítás után $200\ \mu\text{l}$ Na_2CO_3 -oldatot mértünk / $0,5\ \text{N NaOH}$, $10\%\ \text{Na}_2\text{CO}_3$, $0,2\%$ káliumnátriumtartarát/, majd 30 percig szobahőn állni hagytuk. Ezután $20\ \mu\text{l}$ rézreagenst / $0,1\ \text{N NaOH}$, $1,0\%\ \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 2% káliumnátriumtartarát/ adtunk az elegyekhez, és 20 percig ismét állni hagytuk szobahőmérsékleten. Végül $2 \times 300\ \mu\text{l}$ fenolreagenst /Folin-Ciocalteu reagens desztillált vízzel 1:2 arányban hígítva/ mértünk a mintákhoz. A kialakult színintenzitást 30 perc szobahőn történő állás után reagens-vakkal szemben $650\ \text{nm}$ -en $0,5\ \text{cm}$ -es rétegvastagságu küvettában Spektromom 330 fotométeren mértük. A kalibrációs görbét bovine serum albuminnal /BSA/ vettük fel. A görbe $5\text{--}80\ \mu\text{g}$ tartományban lineáris.

2.8. A minták prolaktinkoncentrációjának meghatározása

Az inkubációs médium, illetve a szövethomogenizátumok prolaktintartalmának mérését radioimmun módszerrel végeztük, kettős-antitest elválasztási technikával. A meghatározáshoz az Egészségügyi Világszervezet /WHO/ által, a Humán Reprodukciós Program keretében biztosított anyagokat használtuk, és a módszer kivitelezésében a WHO által kiadott leíráshoz igazodtunk.

A minták higitását RIA-pufferrel végeztük /0,02 M NaH_2PO_4 , 0,08 M Na_2HPO_4 , 0,9% NaCl, 0,01% Thiomersal, 0,5% bovine serum albumin, 0,025 M EDTA, pH = 7,2-7,4/. Jelzett vegyületként ^{125}I -prolaktint használtunk, melynek higitása 0,5% normál nyulszérumot tartalmazó RIA-pufferrel történt. A standard-görbe mérési tartománya 78-2500 mU/l volt.

Az antiprolaktin nyulsavó jellemzői:

antigén: human hipofízis-prolaktin

antiszérum-titer: 1:400000

érzékenység: 65 mU/l / 90% B/B₀ /

specificitás: keresztreakció human növekedési hormonnal 0,05% / B/B₀ = 50% /

A szabad és kötött prolaktin elválasztásához, 48 órás 4°C-on történt inkubálás után antinyul-számár-

szérumot /„second antibody"/ használtunk, mellyel további 18-20 óráig folytattuk az inkubálást. Ezután 1500 x g-n 60 percig centrifugáltuk a mintákat tartalmazó csöveket hűthető centrifugában / Damon/IEC Division /, majd a felüluszt leöntöttük. A kötött frakció radioaktivitását Gamma Spektrométerrel /Tipus NK 350, Gamma Művek, Budapest/ mértük 1 percig.

A módszer megbízhatósága:

„within assay” variációs koefficiens: $\pm 6,2\%$

„between assay” variációs koefficiens: $\pm 12,9\%$

Az inkubációs médiumok, illetve homogenizátumok prolaktinkoncentrációjára mU/l egységben kapott eredményeket átszámítottuk mU prolaktin/100 mg nedves szövetsúly értékekre.

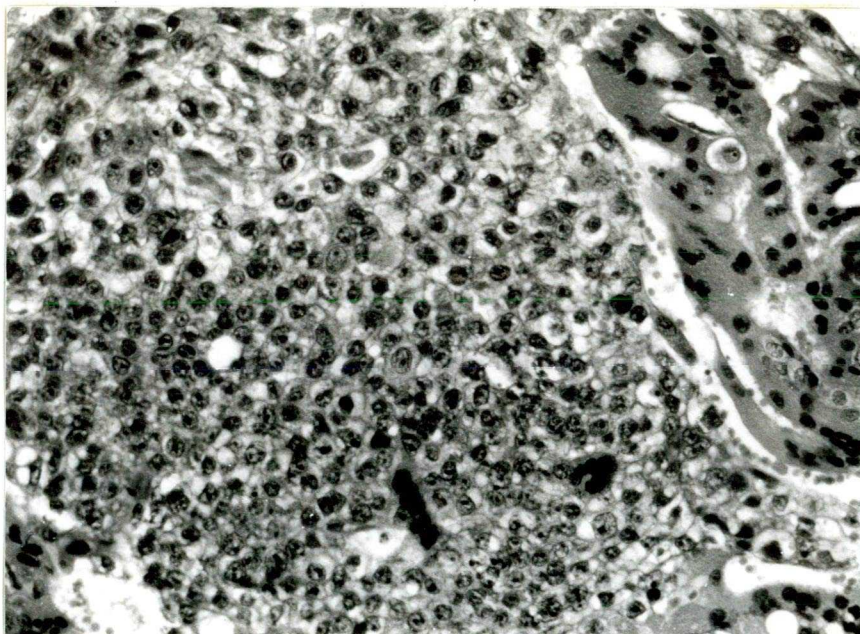
2.9. Az eredmények értékelése során alkalmazott statisztikai számítások

Az inkubáció után a szövethomogenizátumokban mért prolaktinkoncentrációból levonva a kiindulási hormontartalmat /a szövet és puffer prolaktintartalma inkubáció előtt/, meghatároztuk a minták hormontermelését, majd minden terhességi hétre kiszámoltuk ezek átlagát. Az egyes hetek közötti különbséget Student's t test-tel vizsgáltuk, $p < 0,05$ szignifikancia határral.

3. EREDMÉNYEK

3.1. Szövetteni vizsgálatok

A decidua elválasztása a choriontól és amniontól viszonylag egyszerűbb a terhesség első trimeszterében, mint a terminus közelében, de még így is nagy gyakorlatot és tapasztalatot igénylő munka. Ezért a terhességmegszakítások során nyert szövetekből a szétválasztás után metszeteket készítettünk hisztológiai vizsgálatra, a pontos azonosítás céljából. Ennek alapján csak

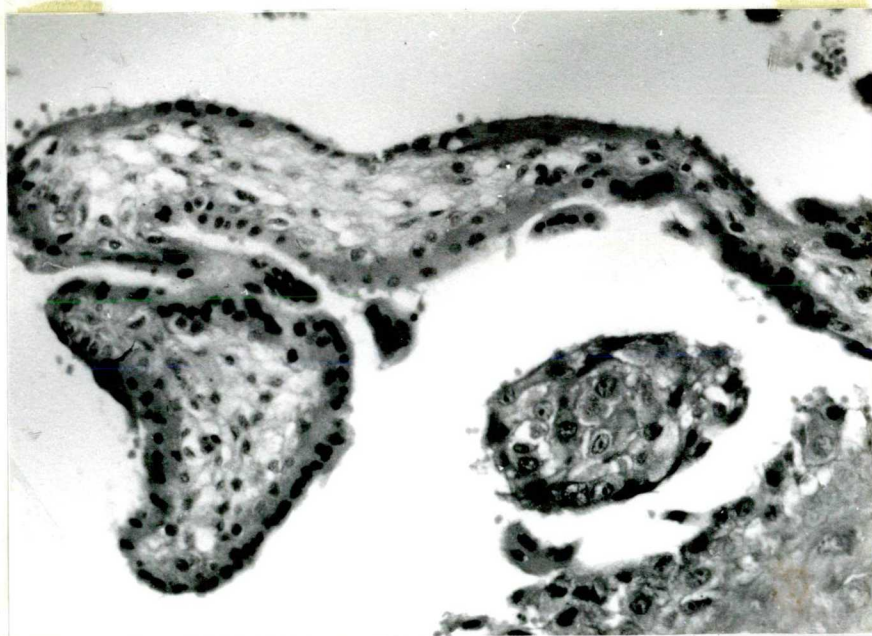


1. ábra

Decidua 240x nagyítású képe; hematoxilin-eozin festés

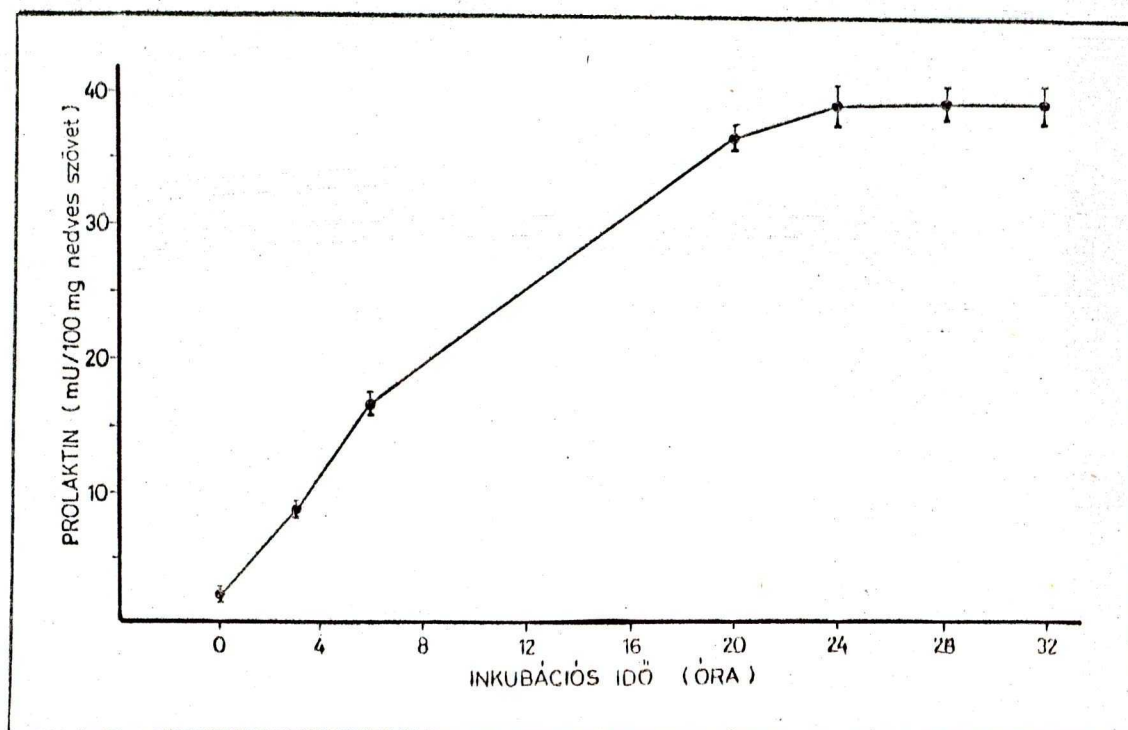
azon minták prolaktinszintézisét értékeltük, melyek csak decíduális, illetve csak choriális szövetet tartalmaztak. Az 1. ábrán decidua compacta részlete látható. A terhességre /tartós progeszteron hatásra/ jellemzően módosult endometrium stromasejtek utcakövezetszerűen rendeződve, egymáshoz szorosan fekszenek. E sejtek citoplazmája bőséges, halvány, glikogénben gazdag.

A 2. ábrán szabályos, ép chorionbolyhok szövettani képe látható. Jól kivehető a choriális hám, mely a külső szinciciotrofoblasztokból és a belső, világos plazmájú Langhans-sejtekből épül fel.



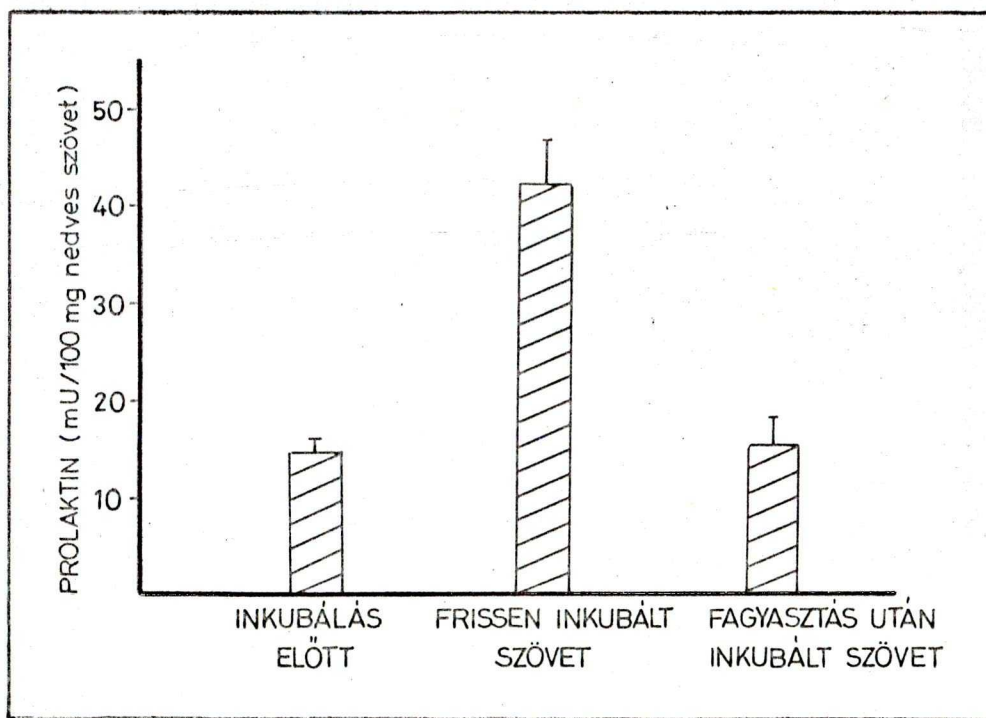
2. ábra

Chorion 240x nagyítású képe; hematoxilin-eozin festés



3. ábra

A prolaktinkoncentráció növekedése a médiumban 32 órás inkubálás alatt. A decíduális szövetek 6 hetes terheségekből származtak. A pontok az átlag $\pm$ SE értéket képviselik; $n = 8$.



4. ábra

Fagyasztás után, illetve frissen inkubált deciduális szövet prolaktinszintézise. A szöveteket inkubálás előtt /kiindulási prolaktintartalom/, valamint 24 órás inkubálás után homogenizáltuk, majd meghatároztuk a puffer és szövet együttes hormontartalmát.

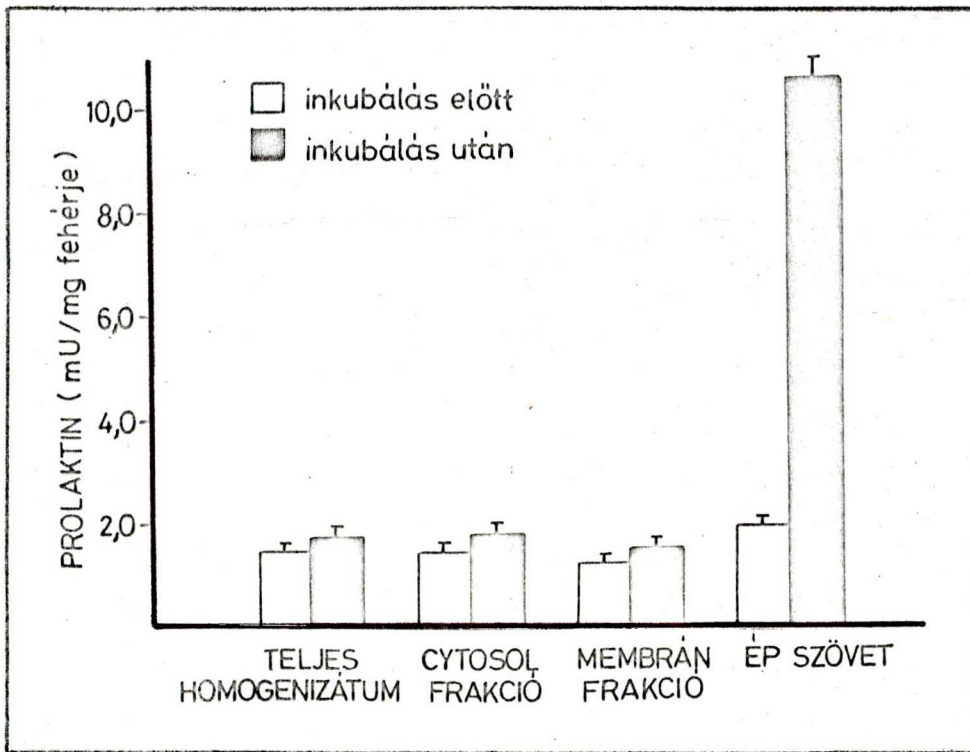
Az oszlopok az átlag $\pm$ SE értéket jelzik; $n = 3$.

3.4. Sejtfrakciók prolaktintermelése

A decíduális szövetet homogenizálás és ultracentrifugálás útján történő durva szétválasztással sejtfrakciókra bontottuk, és vizsgáltuk a cytosol és nyers membrán frakció prolaktinszintetizáló képességét. A 24 órás inkubálás során nem tapasztaltuk a hormonkoncentráció növekedését az inkubáció előtti értékhez képest egyik frakcióban sem, sőt a teljes homogenizátum sem mutatott prolaktintermelést /5. ábra/. Ez az eredmény is alátámasztja az előző megállapítást, mely szerint csak ép strukturájú szövet szintetizál prolaktint in vitro.

3.5. Decidua által in vitro termelt prolaktin immunológiai specificitása

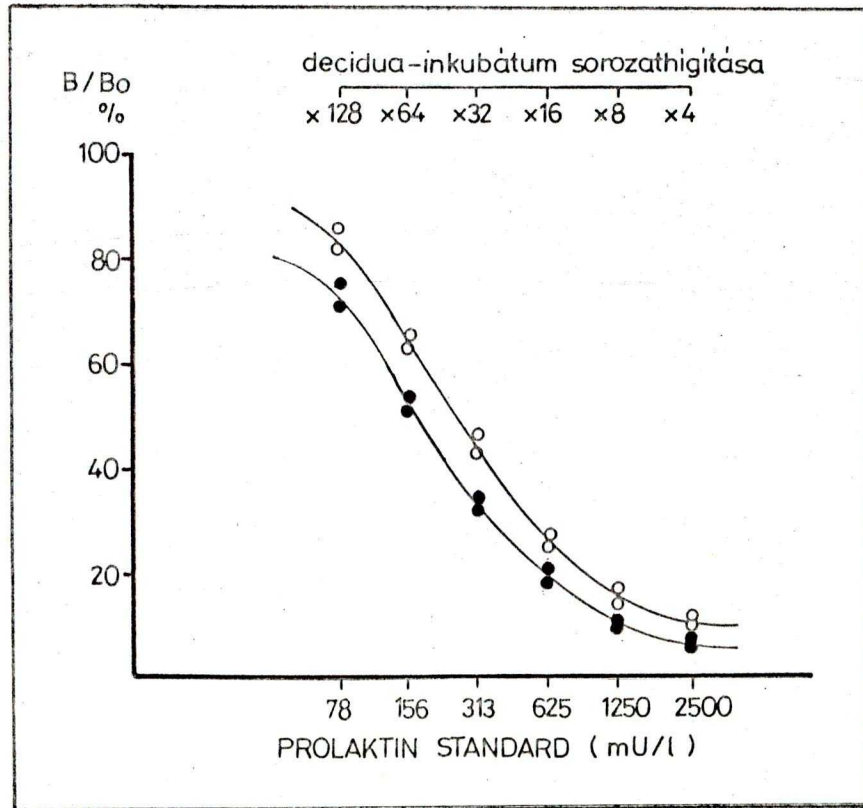
A decidua által szintetizált prolaktin és a hipofízis-prolaktin immunológiai hasonlóságát specifikus human prolaktin-antitesthez való kötődési affinitása alapján tanulmányoztuk. Az inkubációs pufferből sorozathigitást készítve, vizsgáltuk az így nyert higitási görbe parallelizmusát a radioimmun-meghatározás kalibrációs görbéjével. A 6. ábrán látható görbék párhuzamosága bizonyítja, hogy a decidua által termelt prolaktin és a hipofízis-prolaktin immunológiai szempontból azonos peptidhormonok.



5. ábra

Deciduális szövet sejtfrakcióinak in vitro prolaktin-szintézise, összehasonlítva az ép szövet hormontermelésével. Az oszlopok az átlag $\pm$ SE értékeket jelzik.

n = 5



6. ábra

Deciduális prolaktin immunreaktivitása, összehasonlítva human hipofízis-prolaktinnal. Nyolc hetes terhességből származó decidua 24 órás inkubálása után a pufferből készített sorozathígítású minták /o—o/, illetve human hipofízisből izolált prolaktin-standard /●—●/ kötődése a prolaktin-antitesthez.

$B/B_0 = {}^{125}\text{I}$ -prolaktin kötődési aránya az antitesthez

/B = kötődés, prolaktint tartalmazó minta esetén,

B_0 = kötődés, zéro hormondózis esetén/

3.6. Fehérjeszintézist gátló anyag hatása
az in vitro hormontermelésre

A deciduális szövetminták in vitro prolaktin-termelését jelentősen csökkentette a puromycin. Az inkubációs pufferhez 0,1-100 $\mu\text{g/ml}$ vég-koncentrációban adva a puromycint, dóziszfüggően csökkent a médiumban a 24 óra alatt felhalmozódó hormon mennyisége /7. ábra/.

Külön kísérlettel bizonyítottuk, hogy elegendő mennyiségű puromycin teljesen meggátolja a prolaktin in vitro szintézisét /8. ábra/. Az inkubációs médiumban 100 $\mu\text{g/ml}$ vég-koncentrációban jelenlevő puromycin hatására 24 órás inkubálás után a puffer és szövet együttes prolaktintartalma nem különbözött a kontrollértéktől, vagyis a decidua kiindulási hormonkoncentrációjától /24 óra után $12,5 \pm 1,0$ mU/100 mg nedves szövet; 0^{h} időpontban $12,0 \pm 0,9$ mU/100 mg nedves szövet/. Ugyanezen decíduából vett minta fehérjeszintézist gátló vegyület nélkül inkubálva nagy mennyiségű prolaktint termelt / $47,5 \pm 3,5$ mU/100 mg nedves szövet/, ami szignifikánsan különbözött a decidua inkubálás előtti hormontartalmától / $p < 0,001$ /.

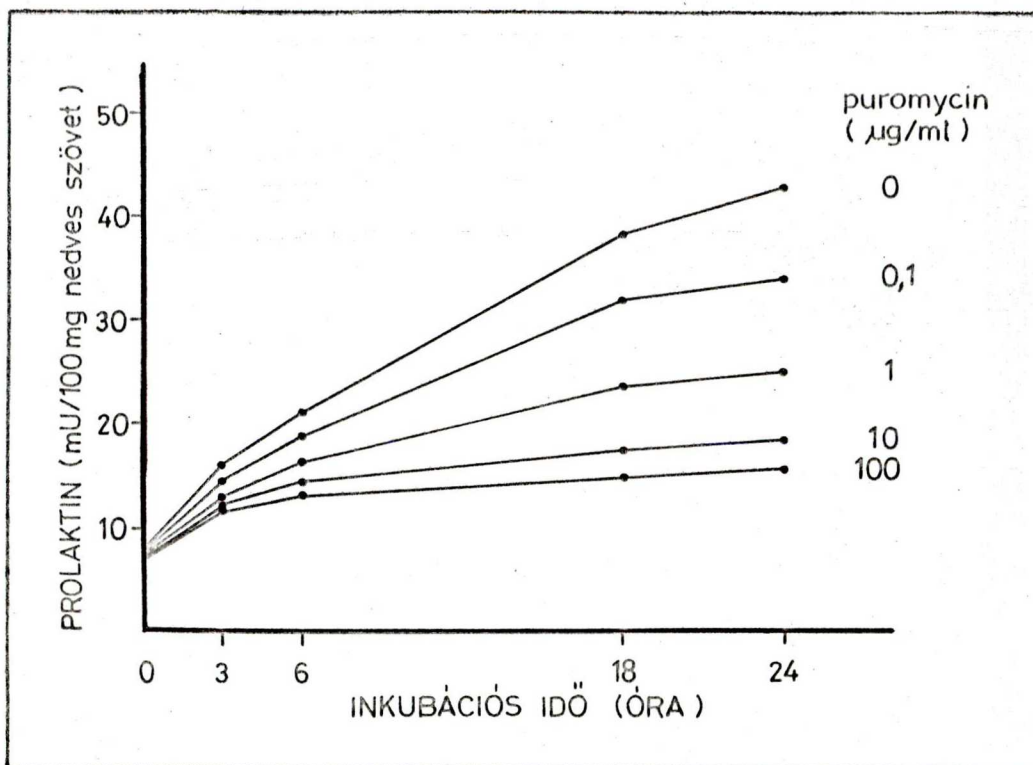
3.2. A prolaktin felhalmozódása az inkubációs pufferben

A prolaktin koncentrációja fokozatosan növekedett a médiumban az inkubálás során, majd a 24. órától a szintézis egyensúlyba került a lebontási folyamatokkal, a rendszer „steady state” állapotot ért el. A hormon felhalmozódását a pufferben, 6 hetes terhességből származó deciduaminták inkubálása esetén, a 3. ábrán mutatjuk be. Az ábra alapján megállapítható, hogy a 24 órás időtartam, az adott körülmények között megfelelő inkubálási idő, mert tovább folytatva az inkubálást, már nem növekedne a prolaktin koncentrációja.

3.3. Fagyasztás hatása a decidua hormontermelésére

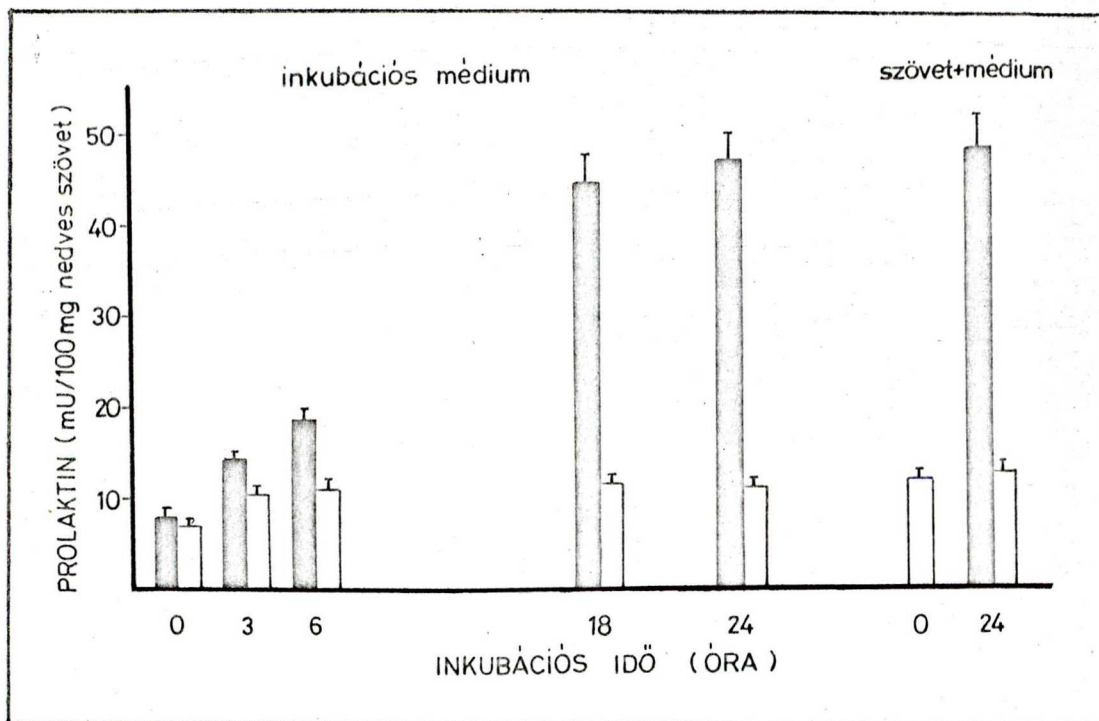
Inkubálás előtt -195°C -ra fagyasztott deciduális szövetekkel végzett kísérleteink kimutatták, hogy csak a friss szövet képes in vitro prolaktinszintézisre. Fagyasztás után inkubált minták esetén, 24 óra elteltével a szövethomogenizátum hormonkoncentrációja nem különbözött a decidua kiindulási prolaktintartalmától. Eredményeinket a 4. ábrán tüntettük fel.





7. ábra

A decidua által termelt prolaktin mennyiségének dózisfüggő csökkenése puromycin jelenlétében végzett inkubálás esetén. A 0,5 g deciduális szövetet tartalmazó inkubációs pufferhez 200 µl desztillált vizet, illetve puromycin-oldatot adtunk, és a megadott időpontokban mintát vettünk.



8. ábra

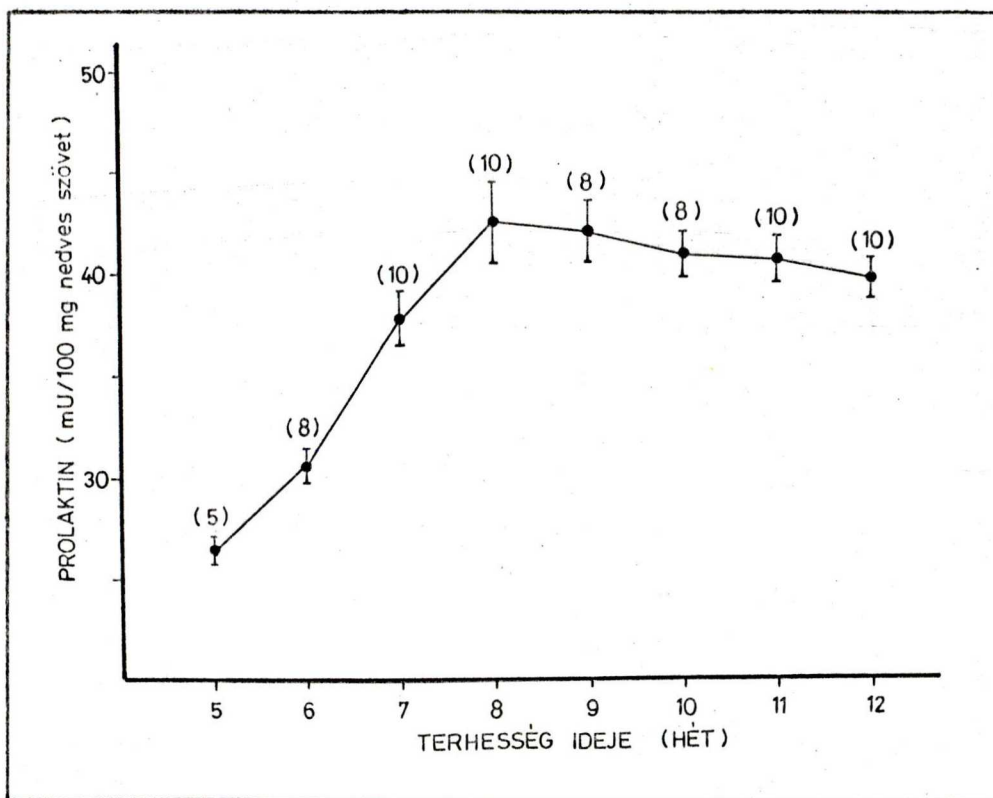
Puromycin gátló hatása a decidua in vitro prolaktinszintézisére. A 0,5 g szövetminták egyrészét puromycin jelenlétében / , másik részét anélkül / , inkubáltuk. A puromycin vég-koncentrációja 100 µg/ml volt. Az oszlopok az átlag ± SE értékeket jelzik; n = 5.

3.7. A decidua in vitro prolaktintermelésének
változása a terhesség első trimeszterében

Munkánk során 69 deciduális szövetet vizsgáltunk, melyek 5-12 hetes koru terhességmegszakításokból származtak. A minták in vitro hormontermelése rohamosan nőtt a terhesség 8. hetéig, ahol maximumot ért el 42,3 mU/100 mg nedves szövet értékkel. A szintézis mértéke ezután nem változott szignifikánsan. A decidua in vitro prolaktinszintézisének változását 5-12 hetes koru terhességben a 9. ábrán tüntettük fel.

3.8. Összefüggés a decidua prolaktintartalma
és hormonszintetizáló képessége között

A terhesség első trimeszterében a deciduális prolaktintermelést tanulmányozva azt tapasztaltuk, hogy intenzívebb hormonszintézis esetén a szövet kiindulási prolaktintartalma is nagyobb volt. A 10. ábrán az inkubálás előtt, illetve után homogenizált szövet prolaktinkoncentrációja látható különböző gesztációs időpontokban. Az összefüggést vizsgálva az adatok között, korrelációt tudtunk kimutatni az inkubálás előtti prolaktintartalom és a decidua hormonszintetizáló kapacitása között /11. ábra/. A korrelációs együttható 0,76 volt / $p < 0,001$ /.

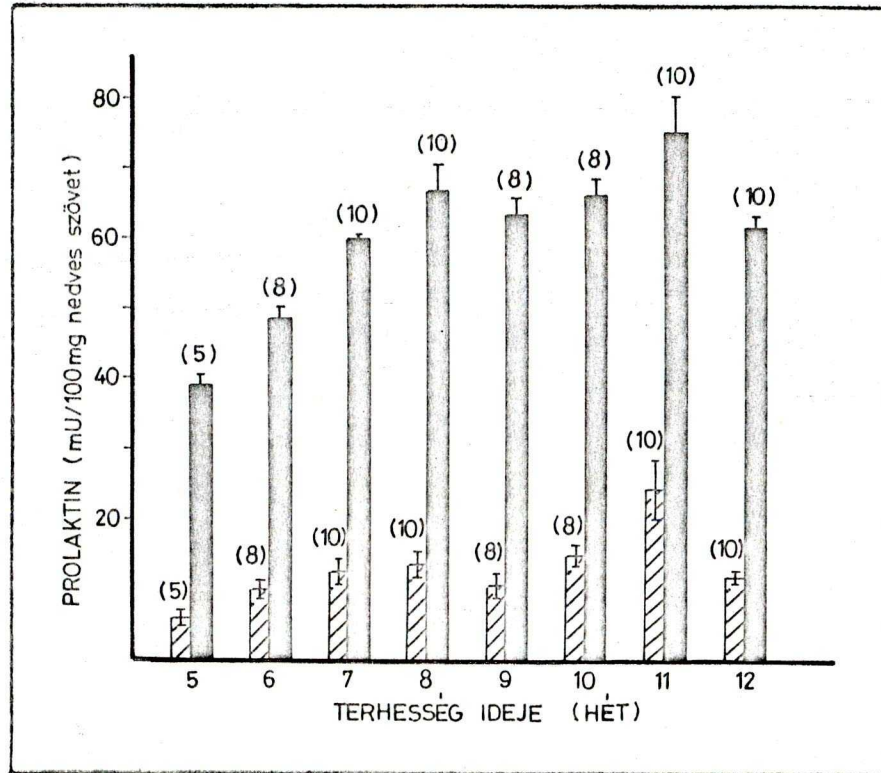


9. ábra

A decidua in vitro prolaktintermelésének változása a terhesség első trimeszterében. Az egyes hetekhez tartozó vizsgálatok számát zárójelben jelezzük.

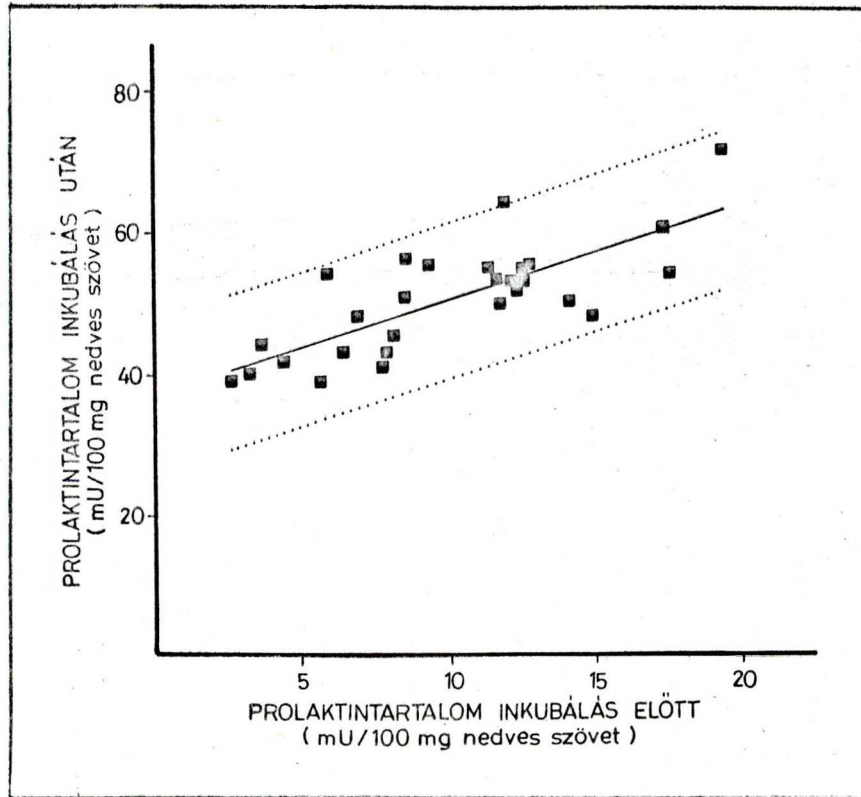
A pontok az átlag $\pm$ SE értéket képviselik.





10. ábra

A decidua kiindulási prolaktintartalmának és szintetizáló képességének változása a terhesség 5-12. hetében. Az inkubációs puffer és szövet együttes prolaktinkoncentrációját mértük inkubálás előtt /▨▨▨/ és 24 órás inkubálás után /■▨▨/. A különböző terhességmegszakításokból származó párhuzamos minták számát zárójelben tüntettük fel. Az oszlopok az átlag $\pm$ SE értéket mutatják.



11. ábra

Összefüggés a decidua kiindulási prolaktintartalma és hormonszintetizáló kapacitása között a terhesség első trimeszterében. A szaggatott vonalak a 95% konfidencia határt adják meg a regressziós egyenesre.

$$/y = 1,34 + 37,1; \quad r = 0,76, \quad p < 0,001/$$

3.9. A chorion in vitro prolaktintermelése

Chorion inkubálása esetén nem halmozódott fel prolaktin sem a szövetben, sem a médiumban. Mind a szövet kiindulási prolaktintartalma, mind in vitro hormontermelése szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a decidaé. Tíz különböző koru terhességből származó choriális szövettel végzett kísérlet alapján az inkubálás előtti prolaktintartalom 0,26 - 0,66 mU/100 mg nedves szövet érték között változott, míg a hormontermelés 0,05 - 1,51 mU/100 mg nedves szövet volt.

4. MEGBESZÉLÉS

A terhesség során a magzatvizben található nagy mennyiségű prolaktin eredete és biológiai funkciója a hetvenes évek elején az érdeklődés előterébe került. Vizsgálták esetleges összefüggését az anyai szérumban-prolaktinszinttel /Biswas 1976/, de szignifikáns korrelációt nem sikerült kimutatni. Fang és Kim /1975/ gélkromatográfiás meghatározásokat végzett a hormon méret-heterogenitására vonatkozóan terminusban, és megállapította, hogy a „nagy” és „kis” prolaktin aránya rendkívül hasonló a fetalis keringésben és a magzatvizben, míg az anyai szérumban ez az arány lényegesen eltérő. Ebből azt a következtetést vonták le egyrészt, hogy az anyai és magzati prolaktinszekréció egymástól független, másrészt hogy a magzatviz-prolaktin fetalis eredetű. Ezt az elképzelést későbbi bizonyítékok cáfolni látszanak.

A magzati és anyai keringés függetlenségét hangsúlyozták Josimovich és mtsai /1974/ is Rhesus majmokon végzett kísérleteik alapján, és az anyai hipofízist jelölték meg a magzatviz-prolaktin fő forrásaként. Az anyai keringésbe adott ^{125}I -prolaktinnak kis része átment az amniális folyadékba, míg a fetalis keringésből nem tapasztalták a jelölt vegyület átjutását a placentán.

A magzatviz-prolaktin eredetét máig sem sikerült teljesen meggyőzően bizonyítani. Több szerző /Riddick és mtsai 1977; Riddick és mtsai 1978; Golander és mtsai 1978; Golander és mtsai 1979; Healy és mtsai 1979; Rosenberg és mtsai 1980; Maslar és mtsai 1980; Kubota és mtsai 1981; Horváth és mtsai (közlés alatt) / kimutatta, hogy a decidua, ami tulajdonképpen átalakult endometriális stromális szövet, és amely strukturális és funkcionális egységet alkot a fetalis membránokkal, nagy mennyiségű prolaktint szintetizál és bocsájt ki in vitro. Ennek alapján a szerzők feltételezik, hogy a decidua lehet a magzatviz-prolaktin forrása. Ha a deciduális szövet által termelt prolaktin képezi az amniális folyadék hormontartalmának fő részét, akkor ennek a prolaktinnak igen könnyen kell átjutnia a deciduális szövetből a membránok magzatviz felőli oldalára a chorionon keresztül. Ezen kívül nem-deciduális eredetű, radioaktív izotóppal jelölt prolaktin csak korlátozott mértékben juthat át a fetalis membránokon bármelyik irányba. Ezt a hipotézist vizsgálták Riddick és mtsai /1981/, és kimutatták, hogy csak a deciduából származó prolaktin transzportálódik jelentős mennyiségben a chorionon át a membránok fetalis oldalára. A transzport biofizikai természetére vonatkozóan a szerzők nem vonnak le következtetéseket. Feltételezésük szerint a chorion mint szemi-permeabilis membrán szerepelhet, vagy pedig a decidua és

chorion között interakció jöhet létre, amely megkönnyíti a prolaktin átjutását. Adataik, miszerint radioaktív izotóppal jelölt prolaktin csak nagyon kis mértékben kerül át a fetalis membránok egyik oldaláról a másikra in vitro körülmények között, összhangban van a korábban említett in vivo eredményekkel.

Munkánk során vizsgáltuk a decidua in vitro prolaktintermelését a terhesség első trimeszterében.

Előzetes kísérletek alapján megállapítottuk, hogy csak friss szövet inkubálása esetén tapasztalható hormontermelés, fagyasztás hatására az in vitro szintézis minimálisra csökken. Csak strukturálisan ép szövet képes prolaktint szintetizálni és kibocsájtani in vitro. Hasonló eredményt kaptunk, ha a deciduát homogenizálással és ultracentrifugálással sejtfrakciókra bontottuk /cytosol és nyers membrán frakció/, és ezeket az intakt szövettel azonos körülmények között inkubáltuk. Sem a teljes homogenizátum, sem a frakciók nem mutattak prolaktintermelést. Ezekre a megfigyelésekre a következőképpen lehetne magyarázatot adni. Feltételezhető, hogy a hormon szintézise olyan intracelluláris reakciókhoz kapcsolódik, melyek a sejt sérülése esetén nem mennek végbe megfelelő módon, illetve a homogenizálás vagy fagyasztás következtében megváltozik a szintézishez szükséges enzimek kofaktoriális környezete, és ezért nem

termel a rendszer prolaktint. Hasonló tapasztalatokról számoltak be López Bernal és mtsai /1982/, akik a decídua 11β -hidroxiszteroid-dehidrogenáz enzimjének aktivitását tanulmányozták in vitro körülmények között. Ezen okok miatt a decídua sejtfrakcióinak további, finomabb szétválasztás utáni vizsgálatát nem végeztük el, és az inkubációs kísérletekhez minden esetben friss szövetet használtunk.

Deciduális szövetminták 24 órás inkubálása során fokozatosan halmozódott fel az inkubációs pufferben a prolaktin, amely immunológiaiilag azonosnak bizonyult a hipofízis-prolaktinnal, specifikus prolaktin-antitesthez való kötődése alapján. A hormontermelés de novo voltát bizonyítottuk fehérjeszintézist gátló anyag hozzáadásával, ami dózisfüggően csökkentette a prolaktin akkumulációját mind az inkubációs médiumban, mind a szövetben. A hormonkoncentráció növekedése a 24 órás inkubálás alatt tehát nem a decíduában már meglévő prolaktin kibocsátásának, hanem a szövet in vitro bioszintézisének a következménye.

A decídua in vitro prolaktintermelése progresszíven emelkedett a terhesség 8. hetéig, ahol maximumot ért el, és ettől kezdve nem mutatott szignifikáns változást a vizsgált időszakban. A második trimeszterben igen ritkán, csak medikális, illetve psycho-szociális in-

dokok alapján végeznek terhességmegszakítást, így erre a periódusra még nincsenek statisztikailag értékelhető adataink. Az a tény, hogy a terhesség első harmadában az in vitro prolaktinszintézis igen gyorsan növekszik az 5-8. hét idején, jó összhangban van azzal az intenzív decíduális átalakulással, mely ebben az időszakban játszódik le az endometriumban.

Összefüggést találtunk a decíduális szövetek kiindulási prolaktintartalma és hormontermelő kapacitása között. A korrelációnak mind elméleti, mind gyakorlati jelentősége van. Elméleti szempontból ez annak további bizonyítéka, hogy a prolaktin jelenléte nem a hormon decíduán történő átjutásának következménye, hanem a de novo szintézis eredménye: nagyobb szöveti prolaktintartalom fokozott termelési kapacitással társul. Gyakorlati jelentősége abban állhat, hogy sorozatvizsgálatoknál nem szükséges a hosszadalmas inkubálást elvégezni, elég a szövet hormontartalmát meghatározni, ez felvilágosítást ad a decídua prolaktinszintetizáló képességére is. A legutóbbi irodalmi adatok szerint /Daly és mtsai 1981/ az endometrium prolaktintermelése fontos diagnosztikus paraméter lehet az infertilitás azon eseteiben, melyeknél az ún. „luteális fázis elégtelenség” az oka annak, hogy nem következik be terhesség. Mivel ennek az állapotnak biztos felismerése meglehetősen nehéz feladat,

nagy segítséget nyújthat a rutin kivizsgálás során az endometrium prolaktintartalmának meghatározása, mely így csak egy radioimmun-analitikai mérést jelent.

Chorion inkubálása esetén nem tapasztaltuk prolaktin felhalmozódását sem az inkubációs pufferben, sem a szövetmintákban. A choriális szövetek preinkubációs hormontartalma is lényegesen alacsonyabb volt, mint a deciduában mérhető prolaktinkoncentráció. A chorionban kimutatható hormonmennyiség valószínűleg a decidua által in vivo termelt prolaktinnak a chorionon keresztül a magzatvizbe történő transzportja során halmozódik fel.

Eredményeink további bizonyítékokat szolgáltatnak annak alátámasztására, hogy a decidua képes in vitro körülmények között prolaktint termelni, és hogy ez a szövet lehet az amniális folyadékban található nagy mennyiségű hormon fő forrása.

Jelenleg a magzatviz-prolaktin biológiai funkciója ismeretlen. Mivel a prolaktin nagy affinitással kötődik az amniális membránokhoz /Josimovich és mtsai 1977/, és befolyásolja a víz- és nátrium-transzportot az amnionon keresztül tengeri malacban /Hold és Perks 1975/, Rhesus majmokban /Josimovich és mtsai 1974/ és emberben /Page és mtsai 1974; Leontic és Tyson 1977;

Leontic és mtsai 1979/, számos kutató szerint a magzat-viz-prolaktin az amniális folyadék térfogatának és ion-tartalmának szabályozásában játszhat szerepet. Csontos halakban, melyekben a hipofízis-prolaktin az ion- és vízháztartást szabályozza, a hipofízis in vitro prolaktintermelése és szekréciója fordított arányban áll az inkubációs médium ozmótikus nyomásával /Ensor 1978/.Ezzel szemben Markoff és mtsai /1982/ úgy találták, hogy a human deciduális szövetek in vitro prolaktinszintézisét nem befolyásolja az extracelluláris ozmolalitás és a nátriumkoncentráció változása. Végeredményben, ha a deciduális prolaktinnak szerepe van az amniális folyadék ozmótikus tulajdonságainak szabályozásában, akkor nem ismerjük azokat a tényezőket, amelyek az ozmolalitás megváltozása folytán a prolaktinszekrécióra hatnak.

Korábbi kutatások bizonyították, hogy a decidua prolaktintermelését nem befolyásolja a thyrotrophin releasing hormone /TRH/, dopamin és bromokriptin, ami szintén azt jelzi, hogy a deciduális prolaktin és a hipofízis-prolaktin szekrécióját, legalább is részben, különböző mechanizmusok szabályozzák /Golander és mtsai 1979/.

Tomita és mtsai /1982/ cAMP-stimulátoroknak a decidua prolaktintermelésére kifejtett hatását vizsgálták annak alapján, hogy a hipofízis prolaktinszekrécióját főként az adenilát-cikláz enzim aktivitása határozza meg, és hogy a human deciduában adenilát-cikláz akti-

vitást sikerült kimutatni /Whittset és Johnsson 1979/. Azonban sem teofillin, sem dibutiril-cAMP, sem GTP jelenléte nem változtatta meg szignifikánsan az inkubáció során felhalmozódó prolaktin mennyiségét. Valószínűnek tartják, hogy a decidua hormontermelésének és szekréciójának rendszere primitívebb természetű, mint a bonyolultabb endokrin mirigyeké. Mindenképpen fontos lenne annak a specifikus mechanizmusnak - ha létezik ilyen - a felderítése, ami a decidua prolaktinkibocsátását kontrollálja.



5. ÖSSZEFOGLALÁS

A magzatvizben található nagy mennyiségű prolaktin legvalószínűbb forrása a deciduális szövet. Vizsgálataink tárgya a decidua in vitro prolaktinszintézise volt korai terhességben. Eredményeink a következők:

1. A terhesség első trimeszteréből származó decidua képes prolaktint termelni in vitro rendszerben.
2. A hormon koncentrációjának növekedése az inkubálás során nem a szövetben már meglévő prolaktin kibocsátásának következménye, mert fehérjeszintézist gátló anyag dóziszfüggően csökkenti a hormontermelést.
3. Csak ép strukturájú szövet szintetizál prolaktint in vitro körülmények között, az elkülönített sejtfrakciók nem.
4. A decidua prolaktintermelése a terhesség 8. hetéig növekszik, majd ettől kezdve a 12. hétig nem mutat szignifikáns változást.
5. Korrelációt találtunk a deciduális szövetek kiindulási prolaktintartalma és hormonszintetizáló kapacitása között.

6. A prolaktin koncentrációja a choriális szövetekben szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult, mint a deciduában, és inkubálásuk során hormontermelést nem tudunk kimutatni.

6. IRODALOM

- BEN-DAVID, M., CHRAMBACH, A.: Preparation of bio- and immunoreactive human prolactin in milligram amounts from amniotic fluid in 60% yield
Endocrinology 101, 250 /1977/
- BEN-DAVID, M., RODBARD, D., BATES, R. W., BRIDSON, W. E., CHRAMBACH, A.: Human prolactin in plasma, amniotic fluid and pituitary: identity and characterization by criteria of electrophoresis and isoelectric focusing in polyacrylamide gel
J. Clin. Endocrinol. Metab. 36, 951 /1973/
- BIGAZZI, M., RONGA, R., LANCRANJAN, I., FERRARO, S., BRANCONI, F., BUZZONI, P., MARTORANA, G., SCARSELLI, G., DEL POZO, E.: A pregnancy in an acromegalic woman during bromocriptine treatment: effects on growth hormone and prolactin in the maternal, fetal and amniotic compartments
J. Clin. Endocrinol. Metab. 48, 9 /1979/
- BISWAS, S.: Prolactin in amniotic fluid: its correlation with maternal plasma prolactin
Clinica Chimica Acta 73, 363 /1976/
- BRYANT, G. D., SILER, T. M., GREENWOOD, F. C., PASTEELS, J. L., ROBYN, C., HUBINONT, P. O.: Radioimmunoassay of a human pituitary prolactin in plasma
Hormones 2, 139 /1971/
- DALY, D. C., MASLAR, I. A., ROSENBERG, S. M., TOHAN, N., RIDDICK, D. H.: Prolactin production by luteal phase defect endometrium
Am. J. Obstet. Gynecol. 140, 587 /1981/

- ENSOR, D. M.: Comparative endocrinology of prolactin
London: Chapman and Hall /1978/
- FANG, V. S., KIM, M. H.: Study on maternal, fetal, and
amniotic human prolactin at term
J. Clin. Endocrinol. Metab. 41, 1030 /1975/
- FRAME, L. T., ROGOL, A. D., RIDDICK, D. H., BACZYNSKI,
E.: Gel chromatographic properties of human prolac-
tin released from decidua tissue in vitro
Fertil. Steril. 31, 647 /1979/
- FRIESEN, H., HWANG, P., GUYDA, H., TOLIS, G., TYSON, J.,
MYERS, R.: A radioimmunoassay for human prolactin
In: Prolactin and Carcinogenesis, Eds.: Boyns, A.
R., and K. Griffiths, Alpha Omega Alpha, Cardiff
1972, pp. 64
- GÁTI, I., DOSZPOD, I., PREISZ, I.: LTH production and
steroid excretion during the menstrual cycle
Acta Physiol. 32, 115 /1967/
- GODÓ, G., SAS, M., MORVAY, J.: Hormonal response to
bromocriptine in functional hyperprolactinaemic con-
ditions
Acta Medica 36, 251 /1979/
- GOLANDER, A., HURLEY, T., BARRETT, J., HANDWERGER, S.:
Synthesis of prolactin by human decidua in vitro
J. Endocrinol. 82, 263 /1979/
- GOLANDER, A., HURLEY, T., BARRETT, J., HIZI, A., HAND-
WERGER, S.: Prolactin synthesis by human chorion-
decidual tissue: a possible source of prolactin in
the amniotic fluid
Science 202, 311 /1978/

- HEALY, D. L., KIMPTON, W. G., MULLER, H. K., BURGER, H. G.: The synthesis of immunoreactive prolactin by decidua-chorion
Br. J. Obstet. Gynaecol. 86, 307 /1979/
- HOLD, W. F., PERKS, A. M.: The effect of prolactin on water movement through the isolated amniotic membrane of the guinea pig
Gen. Comp. Endocr. 26, 153 /1975/
- HORVÁTH, K., FALKAY, G., SAS, M.: Prolactin synthesizing capacity of the human decidua during the first trimester of pregnancy
Acta Medica /in press/
- HWANG, P., GUYDA, H., FRIESEN, H. G.: A radioimmunoassay for human prolactin
Proc. Natl. Acad. U.S.A. 68, 1902 /1971/
- HWANG, P., GUYDA, H., FRIESEN, H. G.: Purification for human prolactin
J. Biol. Chem. 247, 1955 /1972/
- JAFFE, R. B., L'HERMITE, M., MIDGLEY, A. R.: Discussion on studies on prolactin in man. In: Recent Progress in Hormone Research, Ed.: Astwood, E. B., Acad. Press., New York and London, 28, 574 /1972/
- JOSIMOVICH, J. B., MERISKO, K., BOCCELLA, L.: Amniotic prolactin control over amniotic and fetal extracellular fluid water and electrolytes in the rhesus monkey
Endocrinology 100, 564 /1977/
- JOSIMOVICH, J. B., WEISS, G., HUTCHINSON, D.: Sources and deposition of pituitary prolactin in maternal circulation, amniotic fluid, fetus and placenta in the pregnant rhesus monkey
Endocrinology 94, 1364 /1974/

- KUBOTA, T., KUMASAKA, T., YAOI, Y., SUZUKI, A., SAITO, M.: Study on immunoreactive prolactin of decidua in early pregnancy
Acta Endocrinol. 96, 258 /1981/
- KURCZ, M., OROSZ, A.: A szervezet „Anti-Prolaktin” aktivitása
Magyar Endokr. Anyagcsere Társ. II. kongr., Bp., 1965
- LEONTIC, E. A., SCHRUEFER, J. J., ANDREASSEN, B., PINTO, H., TYSON, J. E.: Further evidence for the role of prolactin on human fetoplacental osmoregulation
Am. J. Obstet. Gynecol. 133, 435 /1979/
- LEONTIC, E. A., TYSON, J. E.: Possible osmoregulatory role for amniotic fluid prolactin. In: Prolactin and human reproduction, Eds.: Crosignani, P. G., and Robyn, C., Academic Press, London 1977, pp. 37
- LEWIS, D. J., SINGH, R. N. P., SINHA, Y. N., VANDERLAAN, W. P.: Electrophoretic evidence for human prolactin
J. Clin. Endocrinol. Metab. 33, 153 /1971/
- LÓPEZ BERNAL, A., ANDERSON, A. B. M., TURNBULL, A. C.: Cortisol:cortisone interconversion by human decidua in relation to parturition: effect of tissue manipulation on 11β -hydroxysteroid dehydrogenase activity
J. Endocr. 93, 141 /1982/
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, A. L., FARR, N. J., RANDALL, R. J.: Protein measurement with the Folin-phenol reagent
J. Biol. Chem. 193, 265 /1951/
- LUCIANO, A. A., MASLAR, I. A., KUSMIK, W., RIDDICK, D. H.: Stimulatory activity of serum on prolactin production by human decidua
Am. J. Obstet. Gynecol. 138, 665 /1980/

- MARKOFF, E., BARRY, S., HANDWERGER, S.: Influence of osmolality and ionic environment on the secretion of prolactin by human decidua in vitro
J. Endocr. 92, 103 /1982/
- MASLAR, I. A., KAPLAN, B. M., LUCIANO, A. A., RIDDICK, D. H.: Prolactin production by the endometrium of early human pregnancy
J. Clin. Endocrinol. Metab. 51, 78 /1980/
- MASLAR, I. A., RIDDICK, D. H.: Prolactin production by human endometrium during the normal menstrual cycle
Am. J. Obstet. Gynecol. 135, 751 /1979/
- PAGE, K. R., ABRAMOVICH, D. R., SMITH, M. R.: Water transport across isolated term human amnion
J. Memb. Biol. 18, 49 /1974/
- PORTERFIELD, J. S.: A simple plaque-inhibition test for the study of Arthropod-borne viruses
Bulletin WHO 22, 373 /1960/
- RATHNAM, P., CEDERQVIST, L., SAXENA, R. R.: Isolation of prolactin from human amniotic fluid
Biochim. Biophys. Acta 492, 186 /1977/
- RIDDICK, D. H., KUSMIK, W. F.: Decidua: a possible source of amniotic fluid prolactin
Am. J. Obstet. Gynecol. 127, 187 /1977/
- RIDDICK, D. H., LUCIANO, A. A., KUSMIK, W. F., MASLAR, I. A.: De novo synthesis of prolactin by human decidua
Life Sci. 23, 1913 /1978/
- RIDDICK, D. H., MASLAR, I. A.: The transport of prolactin by human fetal membranes
J. Clin. Endocrinol. Metab. 52, 220 /1981/

- ROGOL, A. D., ROSEN, S. W.: Prolactin of apparent large molecular size: the major immunoreactive prolactin component in plasma of a patient with a pituitary tumor
J. Clin. Endocrinol. Metab. 38, 714 /1974/
- ROSENBERG, S. M., MASLAR, I. A., RIDDICK, D. H.: Decidual production of prolactin in late gestation: further evidence for a decidual source of amniotic fluid prolactin
Am. J. Obstet. Gynecol. 138, 681 /1980/
- SAS, M., GODÓ, GY., MORVAY, J.: Behandlung hyperprolaktinämischer Zustände mit Brom-Ergokryptin
Zbl. Gynak. 100, 1501 /1978/
- SCHENKER, J. G., BEN-DAVID, M., POLISHUK, W. Z.: Prolactin in normal pregnancy: Relationship of maternal, fetal, and amniotic fluid levels
Am. J. Obstet. Gynecol. 129, 834 /1975/
- SUH, H. K., FRANTZ, A. G.: Size heterogeneity of human prolactin in plasma and pituitary extracts
J. Clin. Endocrinol. Metab. 39, 928 /1974/
- TOMITA, K., MCCOSHEN, J. A., FERNANDEZ, C. S., TYSON, J. E.: Immunologic and biologic characteristics of human decidual prolactin
Am. J. Obstet. Gynecol. 142, 420 /1982/
- TYSON, J. E., HWANG, P., GUYDA, H., FRIESEN, H. G.: Studies on prolactin secretion in human pregnancy
Am. J. Obstet. Gynecol. 113, 14 /1972/
- WALSH, S. W., MEYER, R. K., WOLF, R. C., FRIESEN, H. G.: Corpus luteum and fetoplacental functions in monkeys hypophysectomized during late pregnancy
Endocrinology 100, 845 /1977/

WHITTSET, J., JOHNSON, C.: Adenylate cyclase from human decidua
Am. J. Obstet. Gynecol. 133, 479 /1979/

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Őszinte köszönetemet fejezem ki DR. SAS MIHÁLY egyetemi tanár urnak, a SZOTE Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika igazgatójának, aki kezdettől fogva figyelemmel kísérte, és mindenben támogatta disszertációm elkészítését.

Ezuton mondok köszönetet DR. GUBA FERENC egyetemi tanár urnak, a SZOTE Biokémiai Intézete igazgatójának, aki doktoranduszai sorába fogadott, és tanácsaival segítette értekezésem összeállítását.

Köszönettel tartozom DR. MORVAY JÓZSEF egyetemi docens urnak, a SZOTE Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika Laboratórium vezetőjének, aki mindvégig ideális körülményeket biztosított számomra munkám elvégzéséhez.

Megköszönöm DR. FALKAY GYÖRGYNEK, a SZOTE Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika tudományos főmunkatársának értékes szakmai utmutatásait és a kísérletes munkában nyújtott segítségét.

