

# Supresyjny wpływ 17- $\beta$ -estradiolu i progesteronu na proliferację makrofagów *in vitro*

MARTA WOJCIECHOWSKA<sup>1)</sup>, IRMA SPOHR<sup>\*\*</sup>, RICARDO FAUNDEZ<sup>\*\*</sup>,  
ESTER SANCHEZ-TILLO<sup>\*\*</sup>, ANTONIO CELADA<sup>\*\*</sup>, MAREK NIEMIAŁTOWSKI\*

Pracownia Immunologii Katedry Nauk Przedklinikcznych,

\*Zakład Rozrodu Zwierząt, Andrologii i Biotechnologii Rozrodu Katedry Nauk Klinicznych  
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

\*\*Group of Macrophage Biology, Biomedical Research Institute, Barcelona Research Park,  
University of Barcelona, E-08028 Barcelona

Wojciechowska M., Spohr I., Faundez R., Sanchez-Tillo E., Celada A., Niemiałtowski M.  
**Suppressive effect of 17- $\beta$ -estradiol and progesterone on macrophage proliferation**

## Summary

Collaboration between the immunological and hormonal systems in females is crucial for basic cellular and molecular processes responsible for successful reproduction. The aim of this study was to evaluate the effect of estradiol and progesterone on the proliferation of bone marrow derived macrophages of BALB/c (H-2<sup>d</sup>) mice. Applying an *in vitro* model, the study demonstrated that macrophage proliferation is significantly inhibited by estradiol and progesterone when these two hormones are used together, and that apoptosis is involved in this process. This suggests that estradiol and progesterone may temporarily reduce the number of immune cells (macrophages) in the reproductive tract during a particular period of the ovarian cycle when protecting the gametes/embryo against the effector arm of the immune system is the most vital.

**Keywords:** macrophages, proliferation, estradiol, progesterone

Pomyślny rozwój nowego organizmu jest uzależniony od zapewnienia mu właściwych warunków do rozwoju, zarówno w organizmie matki, jak i poza nim. Liczba komórek, w tym komórek układu odpornościowego, odgrywa tu decydującą rolę. Wiadomo, że istnieje związek między układami odpornościowym i hormonalnym, a wpływ hormonów na komórki układu odpornościowego odgrywa u ssaków istotną rolę regulacyjną, w tym w ich rozrodzie (1). Jednymi z ważnych komórek układu odpornościowego są makrofagi, które biorą swój początek w szpiku kostnym. Jako komórki dojrzałe pełnią istotną rolę jako fagocyty oraz produkują różnego rodzaju aktywne biologicznie białka regulacyjne, w tym cytokiny (np. TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-12, IL-18), enzymy (np. kolagenazy, lizozym, proteazy, elastazy) i inne, jak np. fibronektyna czy składniki dopełniacza (12). Do ważnych czynników wpływających na rozwój oraz migrację makrofagów należy czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów (M-CSF – macrophage-colony stimulating factor), który może być wytwarzany przez komórki nabłonka, komórki endotelialne oraz przez same makro-

fagi (3). Natomiast jednym z czynników hamujących migrację makrofagów i wytwarzanie przez nie tlenku azotu i TNF- $\alpha$  jest czynnik zahamowania migracji makrofagów (MIF – migration inhibitory factor), który może być produkowany przez aktywowane limfocyty T, makrofagi i inne komórki nie będące komórkami immunologicznie kompetentnymi. Poza kluczową rolę w mechanizmach obrony nieswoistej makrofagi uczestniczą wspólnie z komórkami dendrytycznymi i limfocytami B w odpowiedzi swoistej. Główną rolą pobudzonych makrofagów jest tutaj prezentacja antygeny limfocytom T CD4<sup>+</sup> w połączeniu z białkami MHC klasy II. Funkcje te makrofagi pełnią w całym organizmie, w tym w układzie rozrodczym, gdzie oprócz roli regulacyjnej biorą udział w mechanizmach zabezpieczających organizm matki i rozwijającego się zarodka/płodu przed zakażeniami bakteryjnymi, grzybiczymi i/lub wirusowymi (6, 15). Wiodącymi etapami w dopuszczeniu do rozwoju i uzyskania pełnej dojrzałości nie tylko makrofagów, ale i innych komórek układu odpornościowego, są zjawiska selekcji pozytywnej i negatywnej, indukujące rozwój wyjściowych komórek prekursorowych. W wyniku selekcji pozytywnej komórki te proliferują, co prowadzi do zwiększenia ich liczby, a jednocześnie przechodzą poszczególne stadia dojrzewania, aż do końcowego stadium

<sup>1)</sup> Stypendystka Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej w ramach Subsydium dla Uczonych (nr 10/2000 dla M. Niemiałtowskiego) oraz International Atomic Energy Agency (nr C6/POL/03006P).

dojrzałej, w pełni aktywnej komórki efektorowej. Ważnym zjawiskiem odgrywającym rolę w rozwoju embrionalnym oraz regulującym homeostazę organizmu, jak również wiele innych procesów w nim zachodzących, jest apoptoza (programowana śmierć komórek), która pod wpływem czynników egzo- i/lub endogennych może ulegać indukcji lub supresji (9). W przypadku zakłócenia apoptozy dochodzi do rozwoju różnych dysfunkcji w organizmie, w tym, między innymi, nowotworów, uszkodzeń tkanek wywołanych niedokrwieniem, chorób neurodegeneracyjnych lub autoimmunologicznych (16). Brak czynników wzrostowych dla komórek, w tym dla makrofagów, prowadzi do ich wyeliminowania na drodze apoptozy (13). Prolifercja komórek, ich życie zgodne z programem zapisanym w kodzie genetycznym oraz równie zaprogramowana śmierć zależy od wielu białek komunikacyjnych i sygnalizacyjnych (np. cytokin) produkowanych przez inne komórki organizmu, jak również od komórek wytwarzających hormony i ich działania endokrynowego. W ten właśnie sposób mechanizmy odpornościowe uczestniczą w kontroli procesów zachodzących w układzie rozrodczym. Celem jest zapewnienie skutecznej obrony organizmu matki przed różnymi czynnikami zakaźnymi oraz, co równie ważne, supresji odpowiedzi immunologicznej poprzez obniżenie aktywności komórek immunologicznie kompetentnych (np. makrofagów), co mogłoby zagrozić gametom oraz rozwijającemu się zarodkowi.

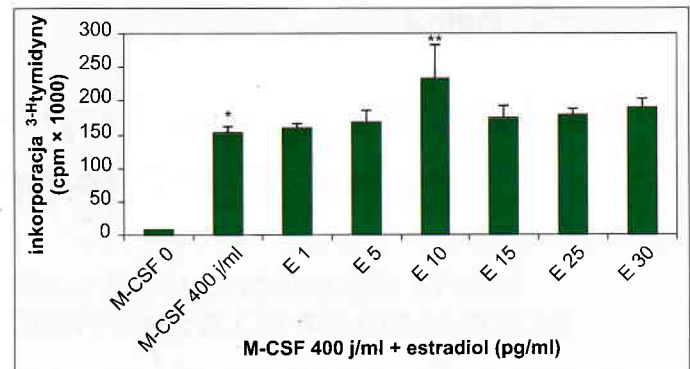
W związku z powyższym celem niniejszej pracy było określenie, w badaniach *in vitro*, wpływu żeńskich steroidowych hormonów płciowych – 17- $\beta$ -estradiolu i progesteronu – na indukowaną M-CSF proliferację makrofagów myszy BALB/c (H-2<sup>d</sup>). 17- $\beta$ -estradiol wraz z innymi hormonami, głównie gonadotropinami, koordynuje cykl jajnikowy oraz stymuluje proliferację komórek warstwy ziarnistej i wzrost pęcherzyków jajnikowych (8). Progesteron natomiast odpowiada za podtrzymanie ciąży oraz rozwój gruczołów mlecznych (7).

### Material i metody

**Izolacja makrofagów.** Komórkami użytymi w badaniach były makrofagi uzyskane ze szpiku kostnego myszy BALB/c (2). Otrzymane makrofagi hodowano w zmodyfikowanym podłożu Eagle'a (DMEM; Biowhitaker, Belgia) uzupełnio-

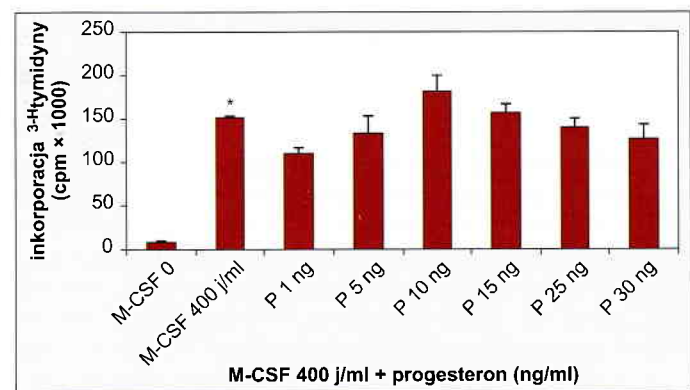
Tab. 1. Dawki estradiolu i progesteronu stosowane w badaniach

Hormon	Stężenia					
Estradiol (E) pg/ml	1	5	10	15	25	30
Progesteron (P) ng/ml	1	5	10	15	25	30
E + P (j/ml)	1	2	3	4	5	6
	1 + 30	5 + 25	10 + 15	15 + 10	25 + 5	30 + 1



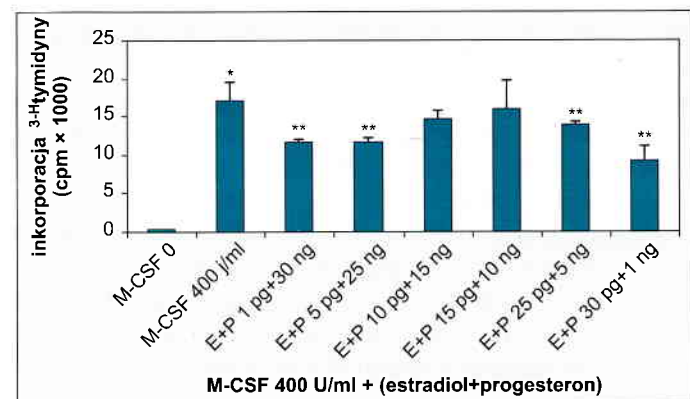
Ryc. 1. Prolifercja makrofagów otrzymanych ze szpiku kostnego myszy BALB/c, wywołwana przez M-CSF (400 j/ml) w obecności wzrastających stężeń estradiolu

Objaśnienia: \* $p < 0,05$  w porównaniu z kontrolą ujemną M-CSF 0; \*\* $p < 0,05$  w porównaniu z kontrolą pozytywną M-CSF 400 j/ml



Ryc. 2. Prolifercja makrofagów otrzymanych ze szpiku kostnego myszy BALB/c, indukowana przez M-CSF, w obecności wzrastających stężeń progesteronu

Objaśnienia: jak w ryc. 1.



Ryc. 3. Prolifercja makrofagów otrzymanych ze szpiku kostnego myszy BALB/c, indukowana przez M-CSF, w obecności estradiolu i progesteronu

Objaśnienia: jak w ryc. 1.

nym 30% supernatantu z linii komórkowej L929 jako źródłem M-CSF (wartość ta odpowiada aktywności M-CSF 1200 j/ml) oraz 20% płodowej surowicy cielęcej (FCS; Gibco). Po 6 dniach hodowli w 37°C i przy 5% CO<sub>2</sub> w atmosferze, gdy ponad 80% stanowiły zadherowane makrofagi, usuwano płyn hodowlany i zastępowano go DMEM bez surowicy i M-CSF. W takich warunkach komórki przetrzymywano 16-18 godzin, po czym stymulowano do pro-



liferacji M-CSF w obecności lub przy braku 17- $\beta$ -estradiolu i progesteronu. Zastosowane dawki hormonów przedstawiono w tab. 1.

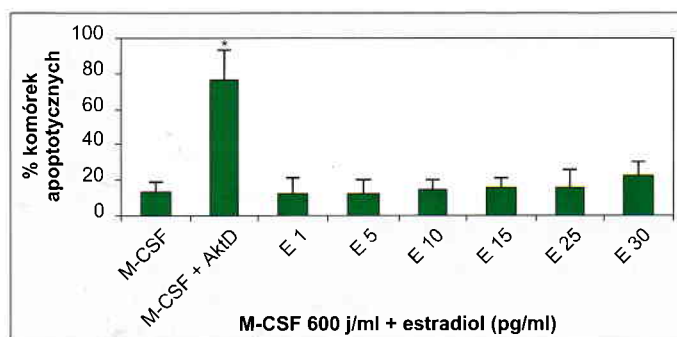
**Badanie proliferacji.** Proliferację makrofagów oceniano w odczynie proliferacji zgodnie z procedurą opisaną wcześniej (13). W skrócie,  $10^6$  komórek umieszczano na płytkach 24-dółkowych (Falcon) w 500  $\mu$ l DMEM bez czerwieni fenolowej. Komórki inkubowano następnie z 17- $\beta$ -estradiolem, progesteronem lub 17- $\beta$ -estradiolem razem z progesteronem, w obecności lub przy braku M-CSF przez 24 godziny w 37°C. Po tym czasie do płynu hodowlanego dodawano tymidynę znakowaną trytem ( $^3$ H; 1  $\mu$ Ci/ml) (Amersham Biosciences). Po 6 godzinach inkubacji w 37°C usuwano płyn hodowlany i utrwalano komórki w lodowatym 70% alkoholu metylowym.  $^3$ H-tymidynę wbudowaną do jądra komórkowego wytrącano płuczając komórki trzykrotnie w lodowatym 10% kwasie trójchlorooctowym, po czym inkubowano je w 1% SDS/0,3 M NaOH w 37°C, aby spowodować zwiększenie przepuszczalności błony komórkowej. Radioaktywność mierzono w liczniku scyntylicyjnym (1400 Tri-Carb Packard Scintillation Counter). Każdą próbę powtórzono trzykrotnie, a wyniki wyrażono jako średnią arytmetyczną.

**Badanie apoptozy.** Badanie apoptozy wykonano z zastosowaniem gotowego zestawu diagnostycznego FITC-A-V Apoptosis Kit (MBL International) według wskazówek producenta. Wynik testu odczytywano w cytometrze przepływowym (FACS Calibur, Coulter Co., USA).

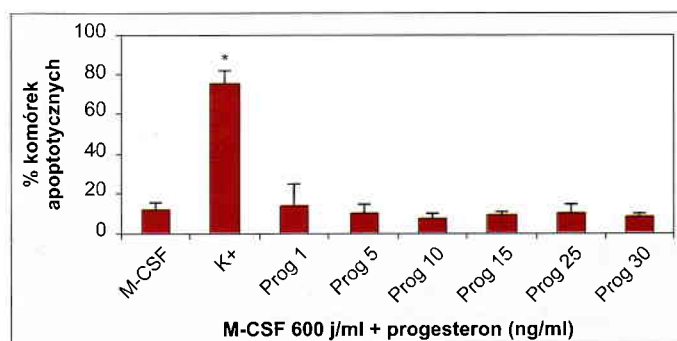
**Analiza statystyczna.** Analizę wyników przeprowadzono z zastosowaniem nieparametrycznego testu U-Manna-Whitneya dla zmiennych niezależnych, wchodzącego w skład programu Statistica 6.0. Różnice pomiędzy uzyskanymi wynikami w poszczególnych grupach doświadczalnych uznano za istotne przy poziomie ufności  $p \leq 0,05$ .

## Wyniki i omówienie

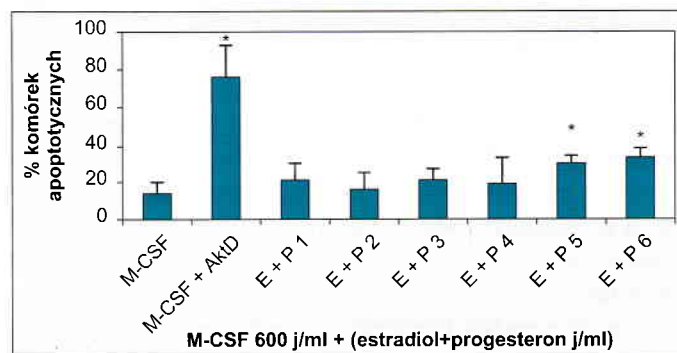
Komórki należące do układu immunologicznego, w tym – bardzo licznie – makrofagi, obecne są w narządach rozrodczych wszystkich gatunków ssaków. Ponieważ zostało stwierdzone, że wielkość ich populacji jest regulowana hormonalnie, celem niniejszych badań było określenie, w układzie *in vitro*, wpływu 17- $\beta$ -estradiolu i progesteronu na proliferację makrofagów, stymulowaną przez M-CSF. W teście proliferacji stwierdzono, że M-CSF o aktywności 400 j/ml istotnie ( $p < 0,05$ ) stymuluje proliferację makrofagów, mierzoną ilością  $^3$ H-tymidyny wbudowanej przez proliferujące komórki (w fazie S cyklu komórkowego). Zastosowanie 17- $\beta$ -estradiolu (ryc. 1) powoduje istotny wzrost proliferacji jedynie przy stężeniu 10 pg/ml, natomiast dodatek progesteronu (ryc. 2) nie wywołuje istotnego wpływu na proliferację makrofagów. Natomiast sytuację odmienną zaobserwowano w grupach badanych, gdzie oceniano wpływ obu hormonów podanych jednocześnie. Progesteron w wysokich (25-30 pg/ml) razem z estradiolem w niskich (1-5 pg/ml) stężeniach, co obrazuje poziom obu hormonów w fazie lutealnej cyklu jajnikowego myszy (4), istotnie ( $p < 0,05$ ) obniża proliferację makrofagów stymulo-



**Ryc. 4.** Apoptoza makrofagów otrzymanych ze szpiku kostnego myszy BALB/c, hodowanych w obecności estradiolu (E) Objaśnienie: \* $p < 0,05$  w porównaniu z kontrolą negatywną M-CSF



**Ryc. 5.** Apoptoza makrofagów otrzymanych ze szpiku kostnego myszy BALB/c hodowanych w obecności progesteronu (Prog) Objaśnienie: jak w ryc. 4.



**Ryc. 6.** Apoptoza makrofagów otrzymanych ze szpiku kostnego myszy BALB/c, hodowanych w obecności estradiolu i progesteronu

Objaśnienia: \* $p < 0,05$  w porównaniu z kontrolą negatywną M-CSF, \*\* $p \leq 0,05$  w porównaniu z kontrolą pozytywną (indukcja apoptozy) M-CSF+AktD

waną przez M-CSF (ryc. 3). Analogiczną sytuację zaobserwowano w przypadku niskich (1-5 ng/ml) progesteronu i wysokich (25-30 pg/ml) 17- $\beta$ -estradiolu, co z kolei odzwierciedla sytuację panującą w fazie pęcherzykowej cyklu jajnikowego (4). Dodatkowo, w grupie tej zaobserwowano istotny ( $p < 0,05$ ) wzrost odsetka komórek apoptotycznych (ryc. 6). Zarówno 17- $\beta$ -estradiol, jak i progesteron podawane osobno do płynu hodowlanego nie wywierały istotnego ( $p > 0,05$ ) wpływu na zachodzenie apoptozy w makrofagach (ryc. 4 i 5). Badania Moreya i wsp. (7) oraz Thongn-

gamma i wsp. (10) pozwoliły na stwierdzenie, że hormony steroidowe mają działanie cytostatyczne lub cytotoksyczne na komórki linii myelomonocytarnej, a także na komórki mięśni gładkich naczyń krwionośnych. W docelowych dla 17- $\beta$ -estradiolu i progesteronu tkankach, to jest w *endometrium* macicy i w gruczołach mlekowych estradiol powoduje wzrost proliferacji komórek, zaś progesteron wywołuje działanie przeciwne (11). Wyniki przedstawionych badań pozwalają określić działanie 17- $\beta$ -estradiolu i progesteronu na makrofagi, w układzie odzwierciedlającym warunki panujące w układzie rozrodczym podczas cyklu jajnikowego myszy. Stymulacja proliferacji makrofagów przez 17- $\beta$ -estradiol potwierdziła wyniki Heryanto i wsp. (5), którzy badali wpływ tego hormonu na proliferację komórek śródbłonka naczyń krwionośnych. Natomiast nową informacją jest fakt hamowania proliferacji makrofagów przez 17- $\beta$ -estradiol i progesteron w dawkach odpowiadających stężeniom obu hormonów w szczycie fazy pęcherzykowej i lutealnej cyklu jajnikowego myszy. W tych okresach w drogach rodnych samicy obecne są gamety. Pojawienie się obcych antygenowo plemników, jak również posiadającego obce antygeny zarodka mogłyby indukować odpowiedź immunologiczną. Z punktu widzenia rozrodczości korzystne jest zatem ograniczenie populacji potencjalnie reaktywnych komórek. Korrelacja wzrostu odsetka komórek apoptotycznych w grupach badanych, gdzie zastosowano wysokie (25 i 30 pg/ml) stężenia 17- $\beta$ -estradiolu i niskie (5 i 1 ng/ml) progesteronu może sugerować, że mechanizmem ograniczania wielkości populacji makrofagów w fazie pęcherzykowej cyklu jajnikowego myszy jest apoptoza. Można również stwierdzić, że 17- $\beta$ -estradiol i progesteron cechują się zdolnością przełamania ochronnego działania M-CSF na makrofagi. Warto jednak zauważyć, że 17- $\beta$ -estradiol i progesteron mają działanie uzależnione od typu komórki docelowej, ponieważ w przypadku komórek monoblastoidalnych 17- $\beta$ -estradiol i progesteron chroniły komórki linii U937 i THP-1 przed apoptozą indukowaną przez TNF- $\alpha$  (14). W podsumowaniu można stwierdzić, że 17- $\beta$ -estradiol i progesteron, w trakcie cyklu jajnikowego myszy hamują proliferację makrofagów, a jednym z mechanizmów ograniczania wielkości populacji tych komórek jest ich apoptoza.

### Piśmiennictwo

1. Bilbo S. D., Nelson R. J.: Sex steroid hormones enhance immune function in male and female Siberian hamsters. *Am. J. Physiol. Reg. Int. Comp. Physiol.* 2001, 280, 207-213.
2. Celada A., Gray P. W., Rinderknecht E., Schreiber R. D.: Evidence for a gamma-interferone receptor that regulates macrophage tumoricidal activity. *J. Exp. Med.* 1984, 160, 55-74.
3. Cohen P. E., Zhu L., Nishimura K., Pollard J. W.: Colony-stimulating factor 1 regulation of neuroendocrine pathways that control gonadal function in mice. *Endocrinology* 2002, 143, 1413-1422.
4. DePaolo L. V., Masoro E. J.: Endocrine hormones in laboratory animals, [w:] *The clinical chemistry of laboratory animals*. Loeb W. F., Quimby F. W., (eds.). New York Academic Press 1989.

5. Heryanto B., Lipson K. E., Rogers P. A.: Effect of angiogenesis inhibitors on oestrogen-mediated endometrial endothelial cell proliferation in the ovariectomized mouse. *Reproduction* 2003, 125, 337-346.
6. Kataoka K., Muta T. I., Yamazaki S., Takeshige K.: Activation of macrophages by linear (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucans. Implications for the recognition of fungi by innate immunity. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 36825-36831.
7. Morey A. K., Pedram A., Razandi M., Prins B. A., Hu R. M., Biesiada E., Levin E. R.: Estrogen and progesterone inhibit vascular smooth muscle proliferation. *Endocrinology* 1997, 3330-3339.
8. Nilsson S., Gustafsson J.-L.: Estrogen receptor transcription and transactivation. *Basic aspects of estrogen action. Breast Cancer Res.* 2000, 2, 360-366.
9. Sanz C., Benito A., Inohara N., Ekhterae D., Nunez D., Fernandez-Luna J. L.: Specific and rapid induction of the proapoptotic protein Hrk after growth factor withdrawal in haematopoietic progenitor cells. *Blood* 2000, 95, 2742-2747.
10. Thongngarm T., Jenkins J. K., Ndebele K., McMurray R. W.: Estrogen and progesterone modulate monocyte cell cycle progression and apoptosis. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2003, 49, 129-138.
11. Tibbets T. A., Coneely O. M., O'Malley B. W.: Progesterone via its receptor antagonizes the pro-inflammatory activity of estrogen in the mouse uterus. *Biol. Reprod.* 1999, 60, 1158-1165.
12. Tizard I. R.: *Veterinary Immunology. An Introduction*, 6<sup>th</sup> Edition 2000, ss. 26-35.
13. Valledor A. F., Comalada M., Xaus J., Celada A.: The differential time-course of extracellular-regulated kinase activity correlates with the macrophage response toward proliferation or activation. *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 7403-7409.
14. Vegeto E., Pollio G., Pellicciari C., Maggi A.: Estrogen and progesterone induction of survival of monoblastoid cells undergoing TNF- $\alpha$ -induced apoptosis. *FASEB J.* 1999, 13, 793-803.
15. Wojciechowska M., Niemiatowski M. G.: Rola makrofagów w układzie rozrodczym ssaków: od Paula Ehrlicha do współczesnej immunologii rozrodu. *Post. Biol. Kom.* 2002, 29, 409-422.
16. Xaus J., Comalada M., Valledor A. F., Card M., Herrero C., Soler C., Lloberas J., Celada A.: Molecular mechanisms involved in macrophage survival, proliferation, activation or apoptosis. *Immunobiol.* 2001, 204, 543-550.

Adres autora: mgr inż. Marta Wojciechowska, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa; e-mail: wojciech@alpha.sggw.waw.pl

**CAMENISCH U., LU Z. H., VAUGHAN L., CORBOZ L., ZIMMERMANN D. R., WITTENBRINK M. M., POSPISCHIL A., SYDLER T.: Badania diagnostyczne nad rolą chlamydiów w przypadku przyspieszonego tempa powrotu rui u świń. (Diagnostic investigation into the role of Chlamydiae in cases of increased rate of return to oestrus in pigs). *Vet. Rec.* 155, 593-596, 2004 (19)**

Pobrano wymazy z szyjki macicy i krew na surowicę od 65 macior z 24 gospodarstw hodowlanych, w których występowały zaburzenia w rozrodczości (grupa A) i od 128 macior z 14 gospodarstw wolnych od tych zaburzeń (grupa B, kontrola). Zbadano też układ rozrodczy 21 macior z grupy A. Zarówno wymazy, jak i układ rozrodczy badano testem PCR (16S rRNA) w kierunku drobnoustrojów z rodzaju *Chlamydia*, a także testem ELISA na obecność lipopolisacharydu tych zarazków. *Chlamydia abortus* (Cp) wyizolowano w 7 z 65 wymazów macior z grupy A. Natomiast *Ch. suis* izolowano zarówno z 1,5% wymazów macior z grupy A, jak i 2,3% wymazów pobranych od macior z grupy B. Ponadto *Ch. abortus* występowała w 33,3% badanych układów rozrodczych. 52,3% surowic macior z grupy A i 66,4% surowic macior z grupy B reagowało pozytywnie w teście ELISA w kierunku zakażenia *Ch. abortus*. Drobnoustroje o właściwościach zbliżonych do chlamydiów (*Chlamydia*-like) wyizolowano z 28,2% wymazów z szyjki macicy macior z grupy A i 22% wymazów z szyjki macicy macior z grupy B.