

Session 7: Experimental Endocrinology

Секция 7: Экспериментальная эндокринология

doi: 10.14341/probl201662549

DOES PROSTACYCLIN (PGI₂) SUPPORT PORCINE CORPUS LUTEUM FUNCTION? — DATA FROM IN VITRO STUDY**M. Szymanska, A. Blitek**

Institute of Animal Reproduction and Food Research of Polish Academy of Sciences, Olsztyn, Poland

Background. Prostacyclin (PGI₂) of luteal origin is involved in the control of corpus luteum (CL) development and function in cattle. PGI₂ may regulate the process of angiogenesis and may stimulate progesterone (P₄) secretion by luteal cells via its specific receptors, PTGIR. In contrast to cattle, the role of PGI₂ in the pig CL has not yet been described.

Aim — the present study aimed to investigate the effect of PGI₂ on 1) P₄ secretion by luteal cells, and 2) the expression of angiogenesis-related genes in endothelial cells of the porcine CL.

Material and methods. CL collected from gilts on day 5—7 of the estrous cycle were used for enzymatic isolation of luteal (Experiment 1) and endothelial (Experiment 2) cells. In Exp. 1, cultured luteal cells were incubated with increasing (0, 0.01, 0.1, 1, 5 μM) doses of PGI₂ analogues: iloprost (ILO) and carbaprostacyclin (cPGI₂) for 8 h. To determine the effective doses of PGI₂ analogues, P₄ concentration in culture medium was examined by RIA. Thereafter, luteal cells were treated with ILO and cPGI₂ at the concentration of 1 and 5 μM in the presence or absence of PTGIR antagonist (CAY10441). After 8 h of incubation the medium was collected for P₄ determination. In Exp. 2, isolated endothelial cells were treated for 24 h with ILO and cPGI₂ at doses of 1 and 5 μM. Then, cells were collected for analysis of Ang-1 and -2 mRNA expression using qPCR.

Results. Both, ILO and cPGI₂ affected P₄ secretion by luteal cells. Elevated levels of P₄ were observed in medium after treatment of luteal cells with 1 μM of ILO and 0.1, 1 and 5 μM of cPGI₂ compared with control values ($p < 0.05$). The addition of CAY10441 inhibited the stimulatory effect of ILO on P₄ secretion, while did not change P₄ production by luteal cells incubated with cPGI₂. Moreover, PGI₂ analogues differentially affected ($p < 0.05$) the expression of proangiogenic factors. ILO stimulated Ang-2, whereas cPGI₂ positively affected Ang-1 mRNA expression in endothelial cells at concentrations of 1 μM and 5 μM, respectively.

Conclusion. PGI₂ affects P₄ secretion during luteal phase of the estrous cycle and may regulate the process of angiogenesis in the porcine CL.

KEYWORDSProstacyclin (PGI₂), corpus luteum, pig.**FOUNDING INFO**

The study was funded by NSC grant 2014/13/N/NZ9/00711.

МОЖЕТ ЛИ ПРОСТАЦИКЛИН (PGI₂) ПОДДЕРЖИВАТЬ ФУНКЦИЮ ЖЕЛТОГО ТЕЛА У СВИНЕЙ? РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ IN VITRO**M. Szymanska, A. Blitek**

Institute of Animal Reproduction and Food Research of Polish Academy of Sciences, Olsztyn, Poland

Обоснование. Простаглицлин (PGI₂) лютеинового происхождения включен в контроль развития и функции жел-

того тела у крупного рогатого скота. PGI₂ может регулировать процесс ангиогенеза и стимулировать секрецию прогестерона лютеиновыми клетками через специфические рецепторы PTGIR. В отличие от крупного рогатого скота, роль PGI₂ в желтом теле свиньи еще не была описана.

Цель исследования — изучение влияния PGI₂ на 1) секрецию P₄ клетками желтого тела и 2) экспрессию ангиогенез-ассоциированных генов в эндотелиальных клетках желтого тела свиньи.

Материал и методы. Желтое тело взято от свинок на 5—7-й день эстрального цикла для ферментативного выделения лютеиновых (эксперимент 1) и эндотелиальных (эксперимент 2) клеток. В 1 эксперименте культивированные лютеиновые клетки были искусственно выведены с повышением (0, 0,01, 0,1, 1, 5 μM) дозы аналогов PGI₂: илопрост (ILO) и карбапростациклин (сPGI₂) в течение 8 ч. Для определения эффективных доз аналогов PGI₂ концентрация P₄ в культуральной среде была выявлена в РИА. После этого лютеиновые клетки были обработаны ILO и сPGI₂ в концентрации 1 и 5 μM в присутствии или отсутствии антагониста PTGIR (CAY10441). После 8 ч инкубации среда была взята для определения P₄. Во 2 эксперименте изолированные эндотелиальные клетки были обработаны в течение 24 ч ILO и сPGI₂ в дозах 1 и 5 μM. Далее клетки взяты на анализ мРНК ангиопоэтина-1 и -2 в количественной ПЦР.

Результаты. ILO и сPGI₂ влияют на секрецию P₄ клетками желтого тела. Повышенные уровни P₄ наблюдались в среде после обработки лютеиновых клеток 1 μM ILO и 0,1, 1 и 5 μM сPGI₂ по сравнению с контрольным значением ($p < 0,05$). Добавление CAY10441 ингибировало стимулирующее влияние ILO на секрецию P₄, в то время как продукция P₄ лютеиновыми клетками инкубированные с сPGI₂ не изменилась. Более того, аналоги PGI₂ избирательно влияют ($p < 0,05$) на экспрессию проангиогенных факторов. ILO стимулирует ангиопоэтин-2, тогда как сPGI₂ позитивно влияет на экспрессию мРНК ангиопоэтина-2 в эндотелиальных клетках в концентрациях 1 μM и 5 μM соответственно.

Выводы. PGI₂ действует на секрецию P₄ в течении лютеиновой фазы эстрального цикла и может регулировать процесс ангиогенеза желтом теле свинок.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВАПростаглицлин (PGI₂), желтое тело, свинья.**ИНФОРМАЦИЯ О ФИНАНСИРОВАНИИ**

Исследование выполнено при поддержке NSC (грант 2014/13/N/NZ9/00711).

★ ★ ★

doi: 10.14341/probl201662549-50

CAN OBESTATIN MODULATE THE GNRH NEURONS ACTIVITY?**M. Szlis, J. Polkowska, A. Wójcik-Gładysz**

The Kielanowski Institute of Animal Physiology and Nutrition, Warsaw, Poland

Obestatin, an anorexigenic peptide acting at the central nervous system and on the peripherial level, can co-create neu-

roendocrine network, which modulate the gonadotrophic axis activity. The aim of this study was to investigate the role of intracerebroventricular obestatin infusion on the activity of the gonadoliberein (GnRH) neurons activity.

The experiment was performed on peripubertal Polish Merino sheep (n=24). Animals were divided into 2 groups: control (Ringer-Lock solution infusions; n=12) and experimental (obestatin infusion, 25µl/120µl/h; n=12). Infusions were performed over three consecutive days; blood samples were collected on day 0 and day 3. After the experiment, the animals were slaughtered, and the chosen brain tissue was preserved for IHC and Real Time RT-qPCR analysis.

It was also shown that exogenous obestatin changes the selected gene expression of GnRH pulse generator, decreases the secretory activity of GnRH neurons, resulting from the inhibition of GnRH release from median eminence terminal nerves, and also decreases the GnRH receptor gene expression in pituitary. On the basis of the obtained results it can be concluded that obestatin may be involved in the modulation of reproduction processes in animals at the level of the central nervous system. However, the mechanism of its action requires further research, especially identifying the obestatin receptor itself.

KEYWORDS

Obestatin, gonadoliberein, central nervous system.

МОЖЕТ ЛИ ОБЕСТАТИН МОДУЛИРОВАТЬ ГОНАДОЛИБЕРИН-ГОРМОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙРОНОВ?

M. Szlis, J. Polkowska, A. Wójcik-Gładysz

Килановский институт физиологии и питания животных
Польской академии наук, Варшава, Польша

Обестатин — анорексигенный пептид, действующий на центральную нервную систему (ЦНС) и на периферические нервы, может осуществлять нейроэндокринную функцию, которая модулирует гонадотрофическую активность аксонов.

Цель исследования — изучить действие интрацеребровентрикулярной инфузии обестатина на гонадolibериную активность нейронов.

Эксперимент был проведен на польских овцах Мерино в перипубертате (n=24). Животные были разделены на 2 группы: 1 — контрольная (инфузии раствора Рингера—Лока; n=12) и экспериментальная (инфузии обестатина, 25/120µl/h; n=12). Инфузии проводились в течение 3 дней подряд; образцы крови взяли на 0 и 3-й день. После эксперимента животные были забиты, и выбранные образцы ткани головного мозга были сохранены для иммуногистохимического анализа и количественной ПЦР в режиме реального времени.

Было показано, что экзогенный обестатин выборочно изменяет экспрессию генов генератора импульсов гонадolibерина, снижает секреторную активность гонадolibерина нейронами в результате ингибирования высвобождения гормона из терминальных нервов срединного возвышения гипоталамуса и также снижает экспрессию генов рецептора гонадolibерина в гипофизе. На основании полученных результатов можно заключить, что обестатин может быть вовлеченным в модуляцию процессов репродукции у животных на уровне ЦНС. Однако механизм его действия требует дальней-

шего изучения, а именно идентификация рецепторов обестатина.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

Обестатин, гонадolibейн, центральная нервная система.

★ ★ ★

doi: 10.14341/probl201662550-51

MIR-30A AND LIN28B CONFORM A DOUBLE- NEGATIVE FEEDBACK LOOP REGULATED BY PI3K MODULATING THYROID CANCER PROGRESSION

L. Wert-Lamas¹, G. Riesco-Eizaguirre², R.I. Gregory³,
P. Santisteban¹

¹Biomedical Research Institute «Alberto Sols», Мадрид, Испания

²Hospital Universitario de Móstoles, Мадрид, Испания

³Harvard Medical School, Бостон, США

Background. Our recent results showed that tumor suppressor miR-30a is firmly downregulated in Thyroid carcinomas. On the other hand, recent studies showed RNA- and DNA-binding proteins LIN28B and HMGA2 induce EMT, thus playing an important role in dedifferentiation and cancer malignification. Finally, latterly several authors agreed on the importance of a robust activation of PI3K for thyroid cancer emergency and progression.

Aim — to study the link between the emergency of LIN28B and HMGA2, miR-30a silencing and PI3K hyperactivation, and to determine their effect on thyroid cancer progression.

Material and methods. MiRNA targets computational predictions were performed with MiRanda algorithm. LIN28B and miR-30a expression vectors were transfected in ATC derived and normal thyroid cell lines; mRNA and protein levels were determined by qPCR, Luciferase and Western Blot. Invasion, proliferation and cell cycle assays were performed in Transwell, cell counter, and FACScan respectively.

Results. MiRanda algorithm identified multiple miR30a recognition elements in all LIN28B, HMGA2 and PI3K effectors. LIN28B expression correlated with PI3K activating mutations in ATC derived cell lines. Overexpression of miR30a resulted in LIN28B, HMGA2, and several PI3K effectors silencing, and in an increase in p27(Kip) protein levels. Inversely, LIN28B overexpressing cells showed a decrease in miR30a levels and an increased expression of HMGA2 and PI3K effectors. The general outcome was a significant decrease in invasion and proliferation in miR-30a overexpressing cells and, conversely, an increase in these parameters by LIN28B.

Conclusions. These data suggest the existence of a PI3K regulated feedback with a double-negative loop between miR-30a and LIN28B. Here, PI3K activation acts to switch the steady states. Initially, high miR-30a levels repress LIN28B expression. After PI3K is activated, LIN28B is produced and miR-30a is repressed. This state reinforces PI3K hyperactivation. Thus, the feedback implements a tumoral gene expression shift, contributing to thyroid cancer progression.

KEYWORDS

Thyroid Cancer, MicroRNA-30a, Network Circuits, HMGA2, LIN28B, PI3K pathway.