

A TESZTOSZTERON 19. METIL CSOPORTJÁNAK JELENTŐSÉGE AZ ANDROGÉN HATÁS BIOKÉMIAI MECHANIZMUSÁBAN

TÓTH MIKLÓS, az orvostudományok kandidátusa,
ZAKÁR TAMÁS, ANTONI FERENC, a biológiai tudományok doktora

Közlésre érkezett: 1975. XII. 15.

A tesztoszteron 19-dezmetil származéka, a 19-nortesztoszteron¹ az ún. anabolikus szteroidok csoportjába tartozik. Ez volt az első kémiai úton előállított tesztoszteron származék, amelyről kimutatták, hogy ivaréretlen vagy kasztrált hím patkánynak adagolva a m. levator ani² jelentős súlynövekedését okozza, de a járulékos hím nemi mirigyek (vesicula seminális, prosztata) súlynövekedésére alig van hatással (Hershberger és mtsi, 1953). Bár ebből az eredményből az anabolikus hatásra *per se* következtetni elvileg kifogásolható (Nimni és Geiger, 1957, Hayes, 1965) mégis érdekes az a probléma, hogy miért okozza a tesztoszteron e csekély szerkezeti módosítása az említett szervekre gyakorolt hatásában észlelt igen jelentős különbséget.

Figyelembe véve a tesztoszteron hatásmechanizmusáról az utóbbi évtizedben végzett kutatásokat, meg kívántuk vizsgálni, hogy a 19-nortesztoszteron patkány vesicula seminálisában észlelt, de a tesztoszteronnal összehasonlítva jelentősen csökkent androgén hatásának mi a biokémiai magyarázata. Számos vizsgálat eredménye támasztja alá, hogy a tesztoszteron a patkány járulékos nemi mirigyeiben részben dihidrotesztoszteronná alakul át, ami először nagy affinitással a citoplazmában található specifikus receptor fehérjéhez kötődik, majd ezt követően a szteroid-receptor komplex bekerül a sejtmagba, ahol a kromatin DNS-éhez és ún. „akceptor” fehérjéihez kapcsolódik (Bruchovsky és Wilson 1968, 1968 a, Anderson és Liao 1968, Mainwaring 1969, Tveter és Unhjem 1969, Unhjem és Tveter 1969, Fang és mtsi 1969, 1971, Baulieu és Jung 1970, Tymoczko és Liao 1971, Mainwaring és Peterken 1971, Steggles és mtsi 1971, Rennie és Bruchovsky 1972, 1973, Nozu és Tamaoki 1974). A kromatinhoz kötött komplex eddig még nem tisztázott módon az RNS polimeráz aktivitásának (Hancock és mtsi 1962, Liao és mtsai 1965) és az RNS szintézis sebességének (Wicks és Kenney 1964, Ito és mtsi 1966, Tóth 1968) fokozódásához vezet. Különösen a nukleoláris RNS polimeráz aktivitása nő (Davies és Griffiths 1973) és a riboszóma RNS szintézise gyorsul

¹ A következő triviális szteroid elnevezéseket használjuk: tesztoszteron = 17 β hidroxil-4-androsztén-3-on; dihidrotesztoszteron = 17 β hidroxil-5 α -androsztán-3-on; 19-nortesztoszteron = 17 β hidroxil-4-ösztren-3-on; dihidro-nortesztoszteron = 17 β hidroxil-5 α -ösztren-3-on

² Pontosabb neve: m. bulbocavernosus dorsalis (Hayes, 1965).

(Liao és mtsi 1966, Liao és Lin 1967). Nő a sejtek mRNS tartalma (Liao és Williams-Ashman 1962, Liao 1965, Mainwaring és mtsi 1974, 1974 a) de különösen nagy mértékű a túlnyomóan poliszóma formában található riboszómák felhalmozódása (Szirmai és mts 1965, Tóth 1970, Mainwaring és Wilce 1973).

Közleményünkben beszámolunk azokról a vizsgálatokról, amelyekben a vesicula seminális specifikus citoplazmatikus és magi androgén kötőhelyeinek szerepét a 19-nortesztozteron és a tesztoszteron RNS szintézisre kifejtett eltérő mértékű hatásában kívántuk meghatározni.

Módszerek és anyagok

Vesicula seminálisokat felnőtt hím patkányokból (Wistar törzs) nyertünk a kasztrálást követő 5. vagy 6. napon. A vesiculák vagdalékát Krebs-féle foszfát pufferes médiumban (Krebs 1950) inkubáltuk, 10–500 nM szteroid kompetitor jelenlétében 10 nM ^3H -tesztoszteronnal vagy 4 nM ^3H -dihidrotesztozteronnal 60 percig 37 °C-on. A kontrolrendszer kompetitort nem tartalmazott. Az inkubálás oxigén atmoszférában, állandó rázatással történt. Ezt követően a reakcióelegyet jeges fürdőben lehűtöttük, a vagdalékot hideg fiziológiás sóoldattal leöblítettük, homogenizáltuk 0.33 M szaharóz, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 3 mM CaCl_2 tartalmú médiumban (A médium). A homogenátot szűrtük 4 réteg gézen. A szűrletet centrifugáltuk 10 percig 900 g-vel (Beckmann J-21 centrifugán), így nyers cytoszól és magfrakciót nyertünk.

A nyers cytoszól frakciót 60 percig 230 000 g-vel centrifugáltuk (Beckmann-Spincó L2 65B centrifugán), az így kapott felülúszó a *cytoszól frakció*. A nyers magfrakciót A médiummal mostuk és szuszpendáltuk 34 ml 2,4 M szaharóz, 3 mM CaCl_2 oldatban (B oldat). A szuszpenziót 5 ml tiszta B oldat fölé rétegeztük és 60 percig centrifugáltuk 22 500 pecenkénti fordulatszámmal a Spincó SW 27 rotort használva (Chauveau és mtsi 1956, Liao és mtsi 1973). A tisztított magfrakciót C oldattal (Rennie és Bruchofsky, 1972 : 5 mM MgCl_2 , 0.1 mM EDTA, 1 mM merkaptóetanol, 50 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5) kétszer mostuk, végül 2 ml 1 M NaCl tartalmú C oldatban szuszpendáltuk. A szuszpenzió egy éjjelen át állt +5 °C-on, majd ultrahang kezeléssel (ARTEK, Sonic 300 Dismembrator, medium tip, 60% teljesítményállásban, 2 percig 0 °C-on) a magokat dezintegráltuk és *homogenizált magfrakcióhoz* jutottunk.

A cytoszól frakció feldolgozása — A cytoszól frakciót 30 szoros térfogat D oldattal (2 mM merkaptóetanol, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5) szemben egyensúlyig dializáltuk +5 °C-on 45 órán át. Feleslegben adott nem jelölt dihidrotesztozteron ez alatt az idő alatt nem cserélte ki a kötött ^3H -dihidrotesztozteront. A dializált cytoszól fehérjetartalmát meghatároztuk (Lowry és mtsi, 1951) és mind a dializált oldat, mind pedig a dializáló puffer aliquot részéből

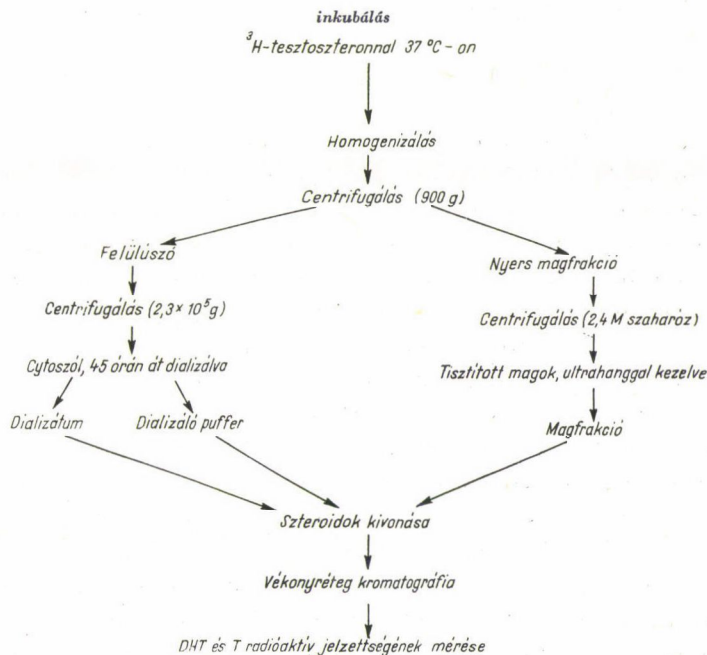
kvantitatív szteroid kivonást végeztünk, 2×3 térfogat dietiléterrel és 1×3 térfogat kloroformmal (Buric és mtsi 1972).

A magfrakció feldolgozása — Aliquot részekből DNS (Dische 1955) és fehérje tartalmat határozunk meg. Fehérjemeghatározásnál lószérum-albumint, DNS meghatározásnál lazac sperma DNS-t használtunk standardként. Magpreparátumainkban a fehérje/DNS arány 3,0—6,0 között változott. A frakció többi részét extraháltuk 1×3 tf. éterrel, 2×3 tf. kloroformmal és 3×3 tf. diklórmétánnal.

Vékonyrétegekromatográfia — A cytoszól dializissel elválasztott két frakciójának és a magfrakciónak az extraktumát vákuumban bepároltuk majd Kieselgél HF₂₅₄ (Merck, Darmstadt NSZK) vékonyrétegen kromatografáltuk tesztoszteron és dihidrotesztoszteron karrierekkal. Futtatószernek kloroform-éter 90 : 10 vagy 85 : 15 elegyét használtuk (Anderson és Liao 1968). A foltok lokalizálását ultraibolya fényben illetve jódgőz adszorpcióval végeztük. A karriereket hordozó gélrészeket lekapartuk, 2 percig 1 ml metanollal ráztuk, szcintillátor koktélt mértünk hozzá és mértük a radioaktivitást.

Rádióaktivitás mérése — A mintákhoz 10 ml szcintillátor koktélt (0,4% PPO, 0,005% POPOP toluolban) adtunk. A radioaktivitást Packard Tri-Carb 2425 spektrométerrel, 43% hatásfokkal mértük.

Számítások a mért értékekből — A dializált cytoszól és a dializáló puffer egységnyi térfogataiban mért radioaktivitások különbsége felelt meg a fehérjé-



I. ábra. A kísérleti módszer sémája.

hez kötött radioaktivitásnak. A magból mosással el nem távolítható radioaktivitást maghoz kötöttnek tekintettük. A megkötött radioaktívan jelzett dihidrotesztoszteron és tesztoszteron mennyiségét a magban cpm/mg DNS, a cytoszól esetében pedig cpm/mg fehérje értékekre számítottuk ki. Módszereinket vázlatosan az 1. ábra foglalja össze.

Tesztoszteron és 19-nortesztoszteron hatása az RNS/DNS hányadosra — Kasztrált patkányok különböző csoportjait kezeltük a levágás előtt 4 napon át tesztoszteron fenilpropionát illetve nortesztoszteron fenilpropionát különböző dózisaival. A szteroid észtereket etilalkohol-etilénglikol 1 : 1 arányú keverékében oldottuk és 0,2 ml-t adagoltunk intraperitoneálisan. A kasztrálás után 17. napon levágott állatok vesiculáinak RNS és DNS tartalmát Schmidt-Tannhauser-Schneider egyesített módszerével (v. ö. Leslie 1955) határoztuk meg. Az orcin reakció (Mejbaum 1939) értékelésében alkalmaztuk a Dische és mtsi (1953) által kidolgozott korrekciós eljárást.

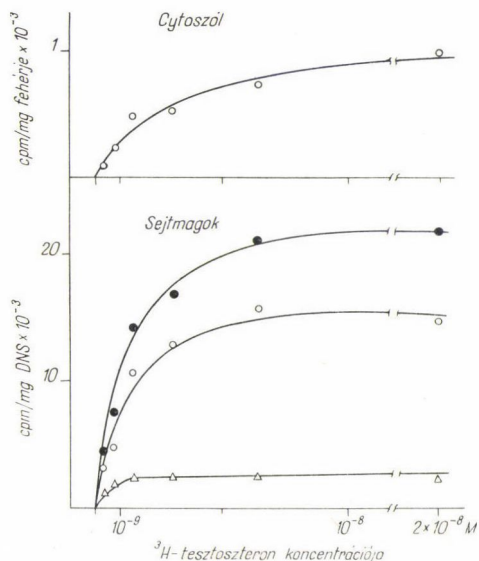
Felhasznált szteroidok — 1,2,6,7 (n) ^3H -tesztoszteron (87 Ci/mmól) és 5 α -dihidro (1 α , 2 α /n/ ^3H) tesztoszteron (47 Ci/mmól) The Radiochemical Centre (Amersham, Anglia) termékei. Tesztoszteront és 19-nortesztoszteront, valamint ezek fenilpropionát észtereit a Kőbányai Gyógyszerárúgyár bocsátotta rendelkezésünkre. Dihidrotesztoszteront Szentirmai A. (Gyógyszeripari Kutató Intézet, Budapest), dihidro-nortesztoszteront W. Klyne professzor és D. N. Kirk (Westfield College, London) ajándékként kaptunk. Valamennyi szteroid kromatográfiásan vizsgálva tisztának bizonyult.

Eredmények

Vesicula vagdalék 1.0—1.5 gramját inkubáltuk 37 °C-on különböző koncentrációjú ^3H -tesztoszteronnal 60 percig és vizsgáltuk az inkubálás során képződött ^3H -dihidrotesztoszteron kötődését. A 2. ábra mutatja, hogy mind a cytoszól fehérjék mind a sejtmagok dihidrotesztoszteron-kötő képessége limitált, és már alacsony, kb. 6 nM tesztoszteron koncentrációnál telítődik. Feltűnő, hogy a cytoszól fehérjék és a sejtmagok dihidrotesztoszteron kötése a különböző tesztoszteron koncentrációknál párhuzamosan változik, és a magfrakcióban mindig található ^3H -dihidrotesztoszteron mellett kis mennyiségű ^3H -tesztoszteron is. A ^3H -tesztoszteron a cytoszól fehérjékhez viszont gyakorlatilag nem kötődik.

Telítési (10 nM) ^3H -tesztoszteron koncentrációnál inkubálva — mint az 1. táblázat mutatja — azt találtuk, hogy a magfraakcióban visszkapott illetve a cytoszól fehérjékhez kötött jelzett szteroidok túlnyomó részét a ^3H -dihidrotesztoszteron képezi. Ez a kötődés szelektív, mivel a cytoszól szabad szteroid frakciójában csak kb. 30% ^3H -dihidrotesztoszteront találtunk. A táblázat adataiból következik az is, hogy a dihidrotesztoszteron mennyiségének aránya a magban, a cytoszól szabad és kötött frakciójában kb. 2:4:1, tehát a ^3H -

dihidrotesztoszteron jelentékeny része kötött formában van. Figyelembe véve a ³H-dihidrotesztoszteron specifikus radioaktivitását kiszámítható, hogy a megkötött szteroid mennyisége a cytoszól fehérje esetében 0,4 pmól/g szövet, a magok esetében pedig 1 pmól/g szövet.



2. ábra. A cytoszól fehérjék és a sejtmagok dihidrotesztoszteron (-o-) kötése különböző ³H-tesztoszteron koncentrációknál végzett, 60 percig tartó inkubálás után. A sejtmagok összes szteroid (-●-) és tesztoszteron (-△-) felvételét is feltüntettük.

Tekintettel arra, hogy a kis kapacitású, de nagy affinitású dihidrotesztoszteron kötőhelyek a cytoszól és a sejtmag receptor fehérjéire jellemzők, megvizsgáltuk, hogy 10 nM, tehát telítési koncentrációban adott ³H-tesztoszteron-

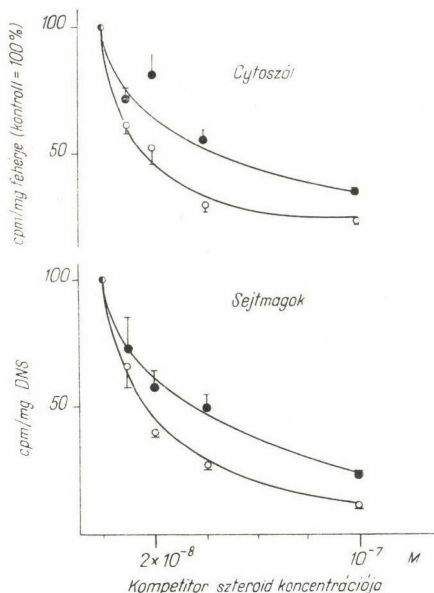
I. táblázat

A magfrakció és a cytoszól frakció ³H-dihidrotesztoszteron és ³H-tesztoszteron tartalma vesicula vagdalék 10 nM ³H-tesztoszteronnal 1 óráig át történt inkubálása után. (átlag ± S.D.; n = 6)

	DPM/g szövet	% DHT	% T
MAG	2,33 × 10 ⁵ ± 3,1 × 10 ⁴	83 ± 4	7 ± 0,7
CYTOSZÓL			
a) szabad	1,35 × 10 ⁶ ± 1,65 × 10 ⁵	29 ± 3	11 ± 2
b) kötött	1,05 × 10 ⁵ ± 1,2 × 10 ⁴	73 ± 11	<5

DHT = Dihidrotesztoszteron
T = Tesztoszteron

nal együtt a rendszerbe vitt 10—100 nM 19-nortesztozsteron hogyan befolyásolja a cytoszól és a magi ^3H -dihidrotesztozsteron-receptor komplexek kialakulását. Kontrollként a nortesztozsteron helyett nem jelzett tesztozsteront tartalmazó reakcióelegyet állítottunk be. Az eredményeket a 3. ábra foglalja össze.

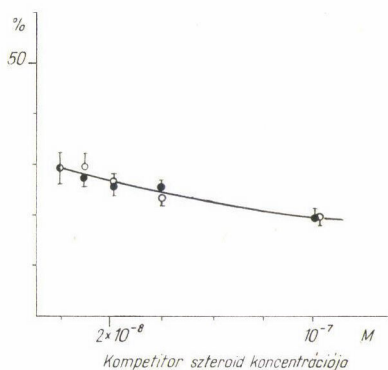


3. ábra. Különböző koncentrációjú 19-nortesztozsteron (●) illetve tesztozsteron (○) hatása ^3H -dihidrotesztozsteron kötődésére a cytoszól és magi receptorokhoz. A vesicula vagdalékot 60 percen át inkubáltuk 10 nM ^3H -tesztozsteron és az ábrán jelzett koncentrációjú kompetitor szteroid jelenlétében. Három kísérlet alapján az átlag \pm S. D. van feltüntetve.

A tesztozsteron hozzáadásával kapott kompetíciós görbék összevetése az elméletileg várható kompetícióval lehetővé teszi annak meghatározását, hogy az aspecifikus, azaz nagy kapacitású és kis affinitású, nem telíthető kötőhelyek kötése mekkora részét képezi a mért kötési értékeknek. Ez a rész a cytoszól fehérjék esetében a kontroll rendszerben mért kötésnek 15%-át, sejtmagok esetében pedig mindössze 5%-át teszi ki.

Az ábrából látható, hogy 19-nortesztozsteron hatására mind a cytoszól mind a magi receptor- ^3H -dihidrotesztozsteron komplexek képződése visszaszorul, de nem annyira, mint azonos koncentrációjú tesztozsteron hatására. Mind a cytoszól mind a magi receptor esetében 50%-os kompetíció eléréséhez mintegy kétszer akkora (30—40 nM) 19-nortesztozsteron koncentrációra van szükség mint az ugyanezt az effektust eredményező tesztozsteron koncentráció (15—20 nM). Megfordítva, ez azt jelenti, hogy a szövetmintában akkor keletkezik ugyanannyi 19-norszteroid-receptor és dihidrotesztozsteron-receptor komplex amikor az inkubáló médiumban a nortesztozsteron-tesztozsteron koncentrációk aránya kb. 2 : 1.

Mint említettük, kísérleteinkben a ^3H -tesztoszteron egyik metabolitjának a kötődését vizsgáltuk. Ezért lehetséges, hogy a mért különbség részben vagy egészben arra vezethető vissza, hogy a metabolit képződésének sebessége a 19-nortesztoszteront illetve a tesztoszteront tartalmazó elegyekben nem egyforma. A 4. ábrából azonban az látható, hogy a cytoszól szabad

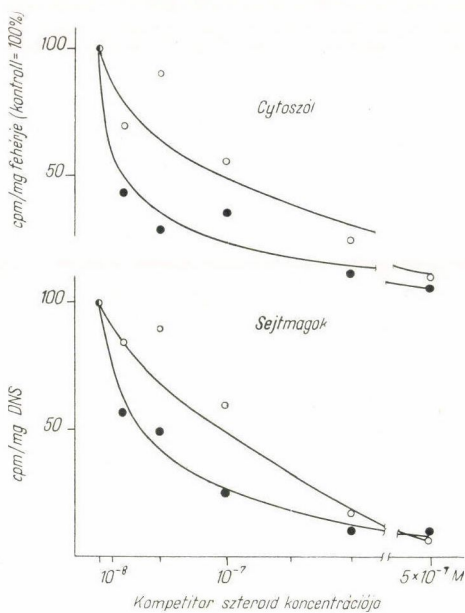


4. ábra. A ^3H -dihidrosztoszteron százalékos aránya a cytoszól szabad szteroid frakciójában a vesicula vagdalék 10 nM ^3H -tesztoszteron és az ábrán jelzett koncentrációjú 19-nortesztoszteron (-●-) illetve tesztoszteron (-○-) jelenlétében 60 percen át végzett inkubálása után. Három kísérlet alapján az átlag \pm S. D. értékeket tüntettük fel.

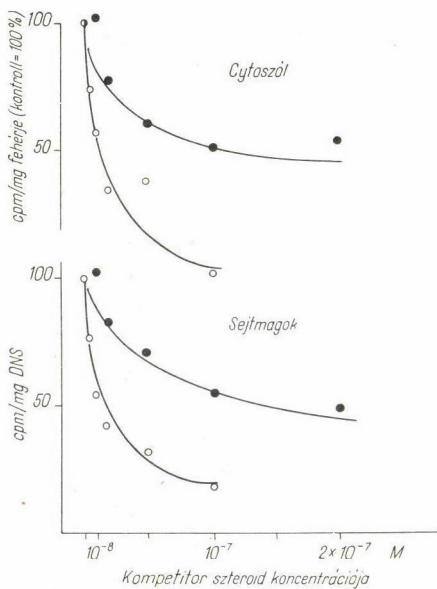
szteroidokat tartalmazó frakciójában visszanyert ^3H -dihidrotesztoszteron mennyisége megközelítően azonos, akármelyik kompetitorral is végeztük az inkubálást. Arra kell tehát gondolnunk, hogy a nortesztoszteron és/vagy valamelyik metabolitja kötődik a cytoszól receptorhoz.

Ez elsősorban a nortesztoszteron 5α -redukált származékáról feltételezhető, ezért összehasonlítottuk 19-nortesztoszteron és dihidro-nortesztoszteron kompetitív hatását a ^3H -dihidrotesztoszteron kötődésére a receptorhoz a ^3H -tesztoszteronnal inkubált vesicula szövetben (5. ábra). Azt találtuk, hogy a dihidro-nortesztoszteron mintegy háromszor kevésbé hatékony kompetitor. Valószínű tehát, hogy akárcsak a prosztata receptor esetében (Liao és mtsi 1973) a vesicula seminálisban is a 19-nortesztoszteron nagyobb affinitással kötődik a cytoszól és magi receptorhoz mint 5α -dihidro származéka.

Azzal a céllal, hogy közvetlenül összehasonlítsuk a 19-nortesztoszteron és a dihidrotesztoszteron affinitását a receptorokhoz, a vesicula vagdaléket 4 nM ^3H -dihidrotesztoszteronnal inkubáltuk és megvizsgáltuk különböző koncentrációjú nortesztoszteron illetve nem jelzett dihidrotesztoszteron kompetitív hatását a ^3H -dihidrotesztoszteron kötődésére (6. ábra). Mind a cytoszól mind a magi receptor esetében a kötés 50%-os gátlását a dihidrotesztoszteronhoz képest mintegy tízszer magasabb koncentrációjú nortesztoszteronnal lehetett elérni. Ha figyelembe vesszük, hogy a ^3H -tesztoszteronból az inkubáláskor keletkező 20–30% ^3H -dihidrotesztoszteron képes csak kötődni a



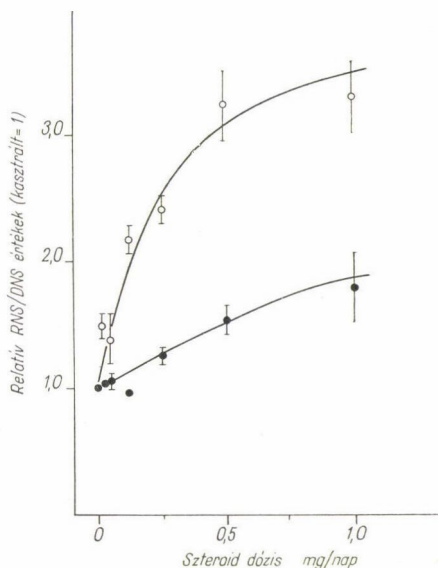
5. ábra. Különböző koncentrációjú dihidro-nortesztozteron (-○-) illetve 19-nortesztozteron (-●-) hatása ^3H -dihidrotesztozteron kötődésére a receptorhoz. A vesicula vagdaléket 60 percen át inkubáltuk $7,5 \text{ nM}$ ^3H -tesztoszteron és az ábrán jelzett koncentrációjú kompetitor szteroid jelenlétében.



6. ábra. Különböző koncentrációjú 19-nortesztozteron (-●-) és dihidrotesztozteron (-○-) hatása ^3H -dihidrotesztozteron kötődésére a receptorokhoz. A vesicula seminális vagdalékát 60 percen át inkubáltuk 4 nM ^3H -dihidrotesztozteron és az ábrán feltüntetett koncentrációjú kompetitor szteroid jelenlétében.

receptorhoz, a 3. ábrán és a 6. ábrán bemutatott kísérletek egyaránt arra mutatnak, hogy a 19-nortesztozsteronnak mintegy tízszer kisebb az affinitása a receptorokhoz mint a dihidrotesztozsteronnak.

A következőkben arra kívántunk információkat kapni, hogy a tesztozsteron és a 19-nortesztozsteron hogyan befolyásolják a kasztrált állat vesiculá-



7. ábra. Tesztozsteron (○) és 19-nortesztozsteron (●) fenilpropionát észtereinek hatása kasztrált patkányok vesicula seminálisának RNS/DNS hányadosára. Az állatok különböző csoportjait (4–6 állat) 4 napon át kezeltük az ábrán jelzett adagokban adott szteroid észterekkel. 4–8 meghatározás átlagát (\pm S. D.) tüntettük fel.

jában az RNS szintézis sebességét. Mint már említettük, androgén hatásra a vesicula sejtekben fokozódik az RNS szintézis sebessége és ennek eredményeképpen növekszik a sejtek RNS tartalma. A vesicula sejtek RNS tartalmának növekedése — ami az RNS/DNS hányados mérésével nyomonkövethető — az RNS szintézis fokozódásának mértéke (Tóth 1968). Ennek alapján hasonlítottuk össze a tesztozsteron és a 19-nortesztozsteron kezeléseket hatását kasztrált patkányok vesicula seminálisainak RNS/DNS hányadosára. A kétféle szteroid fenilpropionát észtereinek adásával dóziszválasz görbéket vettünk fel (7. ábra). A dózis-válasz görbékből leolvasható, hogy azonos RNS/DNS hányados fokozódás eléréséhez a tesztozsteronhoz képest mintegy nyolcszor nagyobb 19-nortesztozsteron dózissra volt szükség, az RNS szintézis fokozásában a tesztozsteron tehát kb. nyolcszor hatékonyabb mint 19-dezmetil származéka.

Megbeszélés

Kísérleteinkben a receptorhoz történő kötődés vizsgálatára a kompetíciós módszert használtuk, így a drága ^3H -nortesztozsteronra nem volt szükség. A kötési kísérleteket szövetvagdalékkal végeztük, ami azzal a hátránnyal jár, hogy a szteroid metabolizmust is figyelembe kell venni, előnye viszont az, hogy a feldolgozás során receptor-szteroid komplexszel dolgozhatunk, ami a receptornál stabilabb. Így értük el, hogy eredményeink reprodukálhatóak és jól értékelhetők voltak.

Kimutattuk, hogy a cytoszól fehérjék és a sejtmagok az inkubáláskor szelektíven, kis kapacitással és nagy affinitással kötik a dihidrotesztozsteront. E kötődés kimutatását elősegítette a kismértékű aspecifikus kötődés, ami részben annak köszönhető, hogy kasztrálás után 5—6 nappal a mirigyek fehérjetartalma erősen csökkent. A cytoszól kötőkapacitására viszonylag alacsony értéket kaptunk, aminek oka az lehet, hogy a fehérjetartalom csökkenése alól — úgy látszik — a cytoszól receptor fehérje sem kivétel (Bruchovsky és Craven, 1975). A magi kötőhelyek száma, figyelembe véve, hogy 1 g vesicula szövetben 3,4 mg DNS (Tóth, 1971) és 1 magban 9,6 pg DNS (Verderly 1955) található, az 1 pmól/g szövet értékből számítva kb. 1900 kötőhely/sejtmag. Ez összhangban van azzal, hogy az androgén (Fang és mtsi 1971, Rennie és Bruchovsky 1972, Mainwaring és Peterken 1971), ösztrogén (Maurer és Chalkley 1967, Baulieu és mtsi 1972) és progreszteron (O'Malley és Means 1974) kötőhelyek számát a célszervek sejtmagjaiban magonként néhány ezerre becsülik.

Kompetíciós kísérleteink eredményeit és a belőlük levont következtetéseket az alábbiakban foglalhatjuk össze: a) Azonos koncentrációjú tesztozsteron illetve 19-nortesztozsteron jelenlétében a ^3H -tesztozsteron átalakítása 5α -dihidro származékká hasonló sebességgel folyik, ami arra mutat, hogy a vesicula seminálisban található 5α -reduktáz, akárcsak a prosztata hasonló enzime (Shimazaki és mtsi 1971), nem tesz különbséget a tesztozsteron és a 19-nortesztozsteron között.

b) A dihidrotesztozsteron, a 19-nortesztozsteron és a dihidronortesztozsteron relatív affinitása a vesicula receptorokhoz 100 : 10 : 3. Hasonló kísérleti feltételek mellett a prosztata magok esetében ugyanezt az affinitási sorrendet de kisebb arányokat (100 : 70 : 60) találtak (Liao és mtsi 1973). Az eltérés magyarázatát a két vizsgálathoz felhasznált szövetminták eltérő szteroid metabolizmusában kereshetjük. Erre utal az is, hogy a prosztata vagdalékot mintegy húszszor magasabb ^3H -tesztozsteron koncentrációnál kell inkubálni ahhoz, hogy a magok dihidrotesztozsteronnal telítődjenek, mint kísérleteinkben a vesiculák vagdalékát (Fang és mtsi 1969).

A 19-nortesztozsteronról kimutatták, hogy prosztata receptorhoz közvetlenül képes kapcsolódni, mégpedig nagyobb affinitással mint 5α -dihidro

származéka (Liao és mtsi 1973). Úgy látszik, ez a vesicula receptorra is érvényes, mivel kevésbé valószínű, hogy valamilyen egyéb norszteroid legyen a legjobban kötődő metabolit. A 3-oxo- és 17 β -hidroxi csoportok szóbajöhető enzimatisz átalakítása ugyanis tesztoszteron esetében mindig az androgenitás nagymértékű csökkenésével járt (Murphy, 1969, Liao és mtsi 1973).

c) A receptorok dihidrotesztoszteron kötésének vizsgálata különböző tesztoszteron koncentrációknál azt mutatta, hogy a cytoszól receptor és a magi receptor kötése között párhuzam van. Ezért a kompetíciós kísérletek nem zárják ki azt a lehetőséget, hogy a cytoplazmában képződött nortesztoszteron-receptor komplex nem jut be a sejtmagba.

Arra, hogy a nortesztoszteron-receptor komplex bejut a magba, és ott fejti ki hatását, közvetve, az RNS szintézis sebességének növekedéséből következtethettünk. A 19-nortesztoszteron kísérleteinkben kimutatott, tesztoszteronhoz képest mintegy nyolcszor kisebb RNS szintézist fokozó hatását kisebb affinitása a receptorhoz csak részben magyarázza, hiszen a 3. ábrán bemutatott kísérlet alapján mintegy kétszeres különbséget várnánk a tesztoszteron javára. Liao és mtsi (1973) más módszerrel és prosztátára nyert adataiból ugyanez a következtetés vonható le: a nortesztoszteron kisebb affinitása a receptorhoz csökkent androgenitását csak részben magyarázza. Mivel az androgén hatás mérése kísérletünkben *in vivo* módszerrel történt, a két szteroid hatása közti viszonylag nagyobb eltérés okaként nem zárható ki esetleges különbség a felszívódásban, a transzportban, a metabolizmus sebességében. Döntő lehet az, hogy a receptorhoz való kisebb affinitása miatt a 19-nortesztoszteront a célszerv nem képes olyan hosszú ideig visszatartani, mint a dihidrotesztoszteront. Végül arra is gondolnunk kell, hogy a nortesztoszteron-receptor komplex transzlokációja a cytoplazmából a sejtmagba lassúbb illetve a magba bekerült komplex kevésbé hatékony az RNS szintézis sebességének fokozásában mint a dihidrotesztoszteron-receptor komplex

Összefoglalás

Kasztrált patkányokból nyert vesicula seminálisok vágdálékát 60 percig inkubáltuk ^3H -tesztoszteront tartalmazó médiumban. Azt találtuk, hogy a cytoszól fehérjék és a sejtmagok a ^3H -dihidrotesztoszteront szelektíven, kis kapacitással és nagy affinitással kötik. Telítési (10 nM) ^3H -tesztoszteron koncentrációnál összehasonlítottuk 10–100 nM 19-nortesztoszteron és nem jelzett tesztoszteron kompetitív hatását a ^3H -dihidrotesztoszteron képződésének sebességére továbbá a cytoszól receptorhoz és sejtmaghoz való kötődésére. Nem találtunk különbséget a két kompetitor azonos koncentrációjánál az inkubáláskor képződő szabad ^3H -dihidrotesztoszteron mennyiségében. Ezzel szemben 19-nortesztoszteron jelenlétében kevésbé szorult vissza a ^3H -dihidrotesztoszteron-receptor komplex képződése mint tesztoszteron jelenlété-

ben. Azonos mértékű kompetíció eléréséhez mind a cytoszól receptorhoz mind a maghoz való kötődés esetében megközelítőleg kétszer nagyobb nortesztozsteron koncentrációra volt szükség. Kísérleteink szerint a 19-nortesztozsteron mintegy háromszor hatékonyabb kompetitor mint a dihidro-nortesztozsteron és kb. tízszer gyengébb mint a nem jelzett dihidrotesztoszteron.

In vivo, a vesicula seminális RNS/DNS hányadosának azonos mértékű emeléséhez kb. nyolcszor annyi 19-nortesztozsteron mint tesztoszteron szükséges. Ezt az adatot a kompetíciós kísérletek eredményeivel összevetve arra következtetünk, hogy a tesztoszteronnak és a 19-nortesztozsteronnak a vesicula seminális RNS anyagszeréjére kifejtett eltérő hatását különböző affinitásuk a cytoszól illetve a magi receptorokhoz részben magyarázza.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton is köszönetet mondunk dr. Fekete György igazgatóhelyettesnek (Kőbányai Gyógyszerárugyár), dr. Szentirmai Attila osztályvezetőnek (Gyógy-szeripari Kutató Intézet), W. Klyne professzornak és D. N. Kirk-nek (West-field College, London), akik a kísérletekben felhasznált szteroidokat rendelkezésünkre bocsájtották. A kísérletek elvégzésében nyújtott lelkiismeretes és szakértő segítségért Szabó Irén laboratoriumi asszisztensnek tartozunk köszönettel.

1. A következő triviális szteroid elnevezéseket használjuk:
 tesztoszteron = 17 β hidroxi-4-andosztén-3-on
 dihidrotesztoszteron = 17 β hidroxi-5 α -androsztan-3-on
 19-nortesztozsteron = 17 β hidroxi-4-ösztén-3-on
 dihidro-nortesztozsteron = 17 β hidroxi-5 α -ösztán-3-on

IRODALOM

- Anderson, K. D. és Liao, S.: Nature, 219, 277 (1968).
 Baulieu, E.E. és Jung, T.: Biochem. Biophys. Res. Commun., **38**, 599 (1970).
 Baulieu, E. E., Alberga, A., Raynaud-Jammet, C. és Wira, C. R.: Nature New Biol., **236**, 236 (1972).
 Bruchovsky, N. és Wilson, J. D.: J. Biol. Chem., **243**, 2012 (1968)
 Bruchovsky, N. és Wilson, J. D.: J. Biol. Chem., **243**, 5953 (1968a).
 Bruchovsky, N. és Craven, S.: Biochem. Biophys. Res. Commun., **62**, 837 (1975).
 Buric, L., Becker, H., Petersen, C. és Voigt, K. D.: Acta Endocrinol. (Kopenhága), **69**, 153 (1972).
 Chauveau, J. Moule, Y. és Royiller, C.: Exp. Cell. Res., **11**, 317 (1956).
 Davies, P. és Griffiths, K.: Biochem. J. **136**, 611 (1973)
 Dische, Z.: In: The Nucleic Acids, (Chargaff, Ed. E., Davidson, J. N.): Acad. Press, N. Y. 1. 285 (1955).
 Dische, Z., Ehrlich, G., Munoz, C. és von Sallmann, L.: Am. J. Ophthalmol., **36**, 54 (1953).
 Fang, S., Anderson, K. M. és Liao, S.: J. Biol. Chem., **244**, 6584 (1969).
 Fang, S. és Liao, S.: J. Biol. Chem. **246**, 16 (1971).

- Hancock, R. L., Zelis, F., Shaw, M. és Williams-Ashman, H. G.: *Biochem. Biophys. Acta*, **55**, 257 (1962)
- Hayes, K. J.: *Acta Endocrinol. (Koppenhága)*, **48**, 337 (1965).
- Hershberger, L. G., Shipley, E. G. és Meyer, R. K.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (N.Y.)*, **83**, 175 (1953).
- Ito, Y., Yamanaka, H. és Shida, K.: *Gunma J. Med. Sci.*, **15**, 142 (1966).
- Krebs, H. A.: *Biochim. Biophys. Acta*, **4**, 249 (1950).
- Leslie, I.: In: *The Nucleic Acids*, (Chargaff, E., ed. Davidson, J. N.: *Acad. Press*, N. Y. **2**, 1 (1955).
- Liao, S. és Williams-Ashman, H. G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **48**, 1956 (1962).
- Liao, S.: *J. Biol. Chem.*, **240**, 1236 (1965).
- Laio, S., Leininger, K. R., Sagher, D. és Barton, R. W.: *Endocrinology* **77**, 763 (1965).
- Liao, S., Barton, R. W. és Lin, A. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **55**, 1593 (1966).
- Liao, S. és Lin, A. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **57**, 379 (1967).
- Liao, S., Liang, T., Fang, S., Castaneda, E. és Shao, T.: *J. Biol. Chem.*, **248**, 6154 (1973).
- Louvy, O. H., Rosenbrough, N. I., Farr, A. L., Randall, A. L.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- Mainwaring, W. I. P.: *J. Endocrinol.*, **45**, 531 (1969).
- Mainwaring, W. I. P. és Peterken, B. M.: *Biochem. J.*, **125**, 285 (1971).
- Mainwaring, W. I. P. és Wilce, P. A.: *Biochem. J.*, **134**, 795 (1973).
- Mainwaring, W. I. P., Wilce, P. A. és Smith, A. E.: *Biochem. J.*, **137**, 513 (1974).
- Mainwaring, W. I. P., Mangan, F. R., Irving, R. A. és Jones, D. A.: *Biochem. J.* **144**, 413 (1974a).
- Maurer, H. R. és Chalkley, G. R.: *J. Mol. Biol.*, **27**, 431 (1967).
- Mejbaum, W. Z.: *Physiol. Chem.*, **258**, 117 (1939).
- Murphy, B. E. P.: In: *Recent Progress in Hormone Research*, **25**, 501 (1969).
- Nimni, M. E. és Geiger, E.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y.*, **94**, 606 (1957).
- Nozu, K. és Tamaoki, B. I.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **58**, 145 (1974).
- O'Malley, B. W. és Means, A. R.: *Science*, **183**, 610 (1974).
- Rennie, P. és Bruchovsky, N.: *J. Biol. Chem.*, **247**, 1546 (1972).
- Rennie, P. és Bruchovsky, N.: *J. Biol. Chem.*, **248**, 3288 (1973).
- Shimazaki, J., Horaguchi, T., Ohki, Y. és Shida, K.: *Endocrinol. Japon.*, **18**, 179 (1971).
- Steggles, A. W., Spelsberg, T. C., Glasser, S. R. és O'Malley, B. W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **68**, 1479 (1971).
- Szirmai, J. A. és Van der Linde, P. C.: *J. Ultrastruct. Res.* **12**, 380 (1965).
- Tóth, M.: *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.* **19**, 519 (1968).
- Tóth, M.: *FEBS Letters*, **8**, 337 (1970).
- Tóth, M.: *Kandidátusi értekezés*, (1971).
- Tveter, K. J. és Unhjem, O.: *Endocrinology* **84**, 963 (1969).
- Tymoczko, J. L. és Liao, S.: *Biochem. Biophys. Acta*, **252**, 607 (1971).
- Unhjem, O. és Tveter, K. J.: *Acta Endocrinol. (Koppenhága)*, **60**, 571 (1969).
- Venderly, R.: In: *The Nucleic Acids*. (Chargaff, E., Ed Davidson, J. N.: *Acad. Press*, N. Y., **2**, 155 (1955).
- Wicks, W. D. és Kenney, F. T.: *Science*, **144**, 1346 (1964).