

Т. В. Бондаренко

Особливості впливу тестостерону на синтез клітинних білків передміхурової залози при гіпо- та гіперпролактинемії

В клетках предстательной железы (ПЖ) половозрелых самцов крыс популяции Вистар изучали изменение активности включения продуктов ^{14}C -гидролизата белка под влиянием тестостерона пропионата в условиях гиперпролактинемии, смоделированной введением препарата лактина и гипопролактинемии, которую создавали, угнетая синтез пролактина с помощью препарата парлодела. Для изучения биосинтеза и концентрации клеточных белков (ядерных и цитоплазматических) ПЖ через сутки после последней инъекции гормонов крысам вводили внутривентриально ^{14}C -гидролизата белка. В интактном организме введение тестостерона пропионата вызывает усиление процессов катаболизма глобулиновых и негистоновых белков. В организме с недостатком пролактина тестостерона пропионат повышает синтез изучаемых белков, что не сопровождается увеличением их концентрации и связано с одновременной активацией их распада. Введение тестостерона пропионата в условиях гиперпролактинемии приводит к понижению концентрации всех белков, кроме негистоновых, что указывает на усиление их катаболизма.

ВСТУП

Як відомо, тестостерон, проникаючи в клітини, чутливі до андрогенів, до яких відносяться і клітини передміхурової залози (ПЗ), запускає низку специфічних біохімічних процесів, котрі складають основу відповіді клітин-мішеней на гормон. Серед різноманітних ефектів тестостерону найбільший інтерес викликає його дія на синтез нуклеїнових кислот і специфічних ядерних білків. Зокрема, в андрогензалежних клітинах під регулювальним впливом тестостерону знаходяться реплікація дезоксирибонуклеїнової кислоти [13] та генетично залежний синтез “de novo” рибонуклеїнових кислот [11]. У свою чергу регуляція активності генетичного апарату клітин відбувається за участі гістонових і негістонових білків у цьому процесі. Численними експериментами виявлено репресорний вплив гістонових білків на

активність ДНК [2, 18]. Є багато даних про депресивний вплив негістонових білків на процес транскрипції [4, 7]. Таким чином, участь цих білків у функціональних можливостях хроматинового комплексу андрогензалежних клітин не викликає сумнівів, хоча деталі цього механізму потребують уточнення.

Тестостерон стимулює матричну активність ДНК через його взаємодію з гістоновими білками генетичного апарату [17]. Деякі автори вважають, що у цій ситуації суттєву роль відіграє взаємодія тестостерону з кислими білками (негістонові білки) [9]. Експериментальних даних про вплив тестостерону на синтез гістонових і негістонових білків хроматину немає.

При визначенні впливу андрогенів на геном клітин ПЗ слід звернути увагу на взаємодію цих стероїдів із гормонами інших ендокринних залоз. Так, дослідженнями ос-

таних років доведено активну участь у розвитку та функціонуванні ПЗ гормонів аденогіпофіза, серед яких особливо важлива роль належить пролактину. Показано, що останній, насамперед, бере участь у регулюванні внутрішньоклітинних процесів у ПЗ, впливаючи на активність ферментативного перетворення тестостерону на активні метаболіти [8, 12, 21]. Водночас вплив пролактину на регуляцію активності геному у клітинах ПЗ майже не вивчено, хоча відповідна інформація необхідна, перш за все, для визначення його ролі в процесах росту та гіпертрофії ПЗ.

Мета наших досліджень – вивчення впливу тестостерону пропіонату на активність включення продуктів ^{14}C -гідролізату білка в ядерні білки (глобуліни), гістонові, негістонові та цитоплазматичні білки ПЗ за умов гіпо- та гіперпролактинемії.

МЕТОДИКА

Дослідження виконано на 160 статевозрілих щурах-самцях популяції Вістар масою 140 – 160 г. Гіперпролактинемію моделювали введенням внутрішньом'язово протягом 10 діб 0,2 мл водного розчину лактину (пролактин великої рогатої худоби) в дозі 3,5 од./100 г. В інший серії експериментів відтворювали гіпопролактинемію пригніченням секреції пролактину за допомогою введення препарату парлоделу у дозі 750 мкг/100 г двічі на добу протягом 14 діб. Під час вивчення комплексного впливу гормонів аденогіпофіза на ефект тестостерону спочатку тваринам вводили лактин або парлодел, а потім олійний розчин тестостерону пропіонату протягом 3 діб у дозі 2 мг/кг. Щури контрольних груп отримували еквівалентні об'єми розчинників – дистильованої води та персикової олії окремо або в комбінації за схемами, аналогічними введенню гормонів.

Для вивчення біосинтезу клітинних (ядерних та цитоплазматичних) білків через добу після останньої ін'єкції гормонів щурам вво-

дили внутрішньоочеревинно ^{14}C -гідролізат у дозі 1,11 МБк на 100 г (питома радіоактивність 1,48 ГБк/Матом С). Через 60 хв тварин швидко декапітували під слабким ефірним наркозом. ПЗ зважували та піддавали подальшій обробці на льоду. Глобуліни із ядер двічі екстрагували за допомогою 0,14 моль/л NaCl [3]. Гістонові білки вилучали за допомогою кислотної екстракції (0,25 моль/л HCl) протягом 3 год [10]. Екстракцію негістонових білків із осаду ядер проводили за допомогою 0,025 моль/л NaOH протягом 2 – 3 год [6], з наступним центрифугуванням при 6000 хв $^{-1}$ протягом 20 – 25 хв. Надосадову рідину після зсідання ядер використовували для отримання цитоплазматичних білків [14].

Для вивчення клітинних білків тканину ПЗ гомогенізували у сахарозі (0,25 моль/л) з MgCl_2 (0,005 моль/л), рН 6,0 у скляному гомогенізаторі. Гомогенат фільтрували через три шари марлі та центрифугували протягом 20 хв при 2000 хв $^{-1}$. Осад ядер промивали сахарозою (0,32 моль/л) з MgCl_2 (0,003 моль/л), з послідовним центрифугуванням при 1800, 1500, 1200 та 800 хв $^{-1}$. Осад ядер відмивали при 800 хв $^{-1}$, поки він буде світлим. Чистоту ядерних фракцій перевіряли під мікроскопом. Для визначення активності синтезу білків за включенням мічених попередників до певної кількості досліджуваних фракцій додавали 10 мл сцинтиляційної рідини ЖС-7. Радіоактивність проб підраховували за допомогою лічильника “Бета-2”.

Оптичну щільність отриманих зразків білкових фракцій, які вивчалися, визначали на спектрофотометрі “Спекорд – UV VIS (Carl Zeiss, Jena, Австрія)”; кількісний вміст білка у пробі розраховували за формулою [5]: $C = 1,45 \cdot E_{260} - 0,74 \cdot E_{280}$ мг/мл. Концентрацію білків у ПЗ визначали в міліграмах на 1 г тканини.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили загальноприйнятими методами [1].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

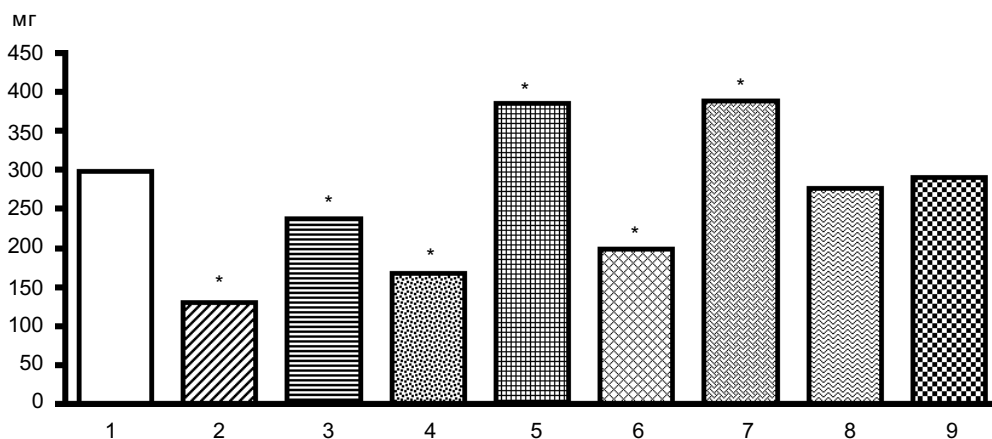
Як видно з результатів, наведених на рисунку, введення розчинників призводило до вірогідного зниження маси ПЗ, що можливо є результатом стресорної дії на тварин ін'єкції розчинів. Гіперпролактинемія та введення тестостерону пропіонату на її тлі призвело до збільшення маси ПЗ, що узгоджується з літературними даними [19, 20]. Водночас парлодел та застосування на його тлі тестостерону пропіонату не змінювали масу ПЗ. На відміну від наших результатів, у дослідженнях на мишах та щурах з дефіцитом пролактину деякі автори спостерігали зниження маси вентральної частки ПЗ [15,16]. Можливо, ця відмінність пов'язана з тим, що ми визначали масу усієї ПЗ, а не тільки її вентральної частки.

Зміни концентрації та синтезу клітинних білків відображені в табл. 1,2. Слід відмітити, що введення води значно підвищувало включення продуктів ^{14}C -гідролізату білка в усі клітинні білки, хоча концентрація цитоплазматичних білків виразно зменшувалася, гістонових і негістонових – не змінювалася, а глобулінів – дещо зростала (табл. 1, групи 1,2; $P < 0,02$). Ми припускаємо, що таке підвищення метаболізму білків пов'язано з дією стресу.

Такий стан гіперпролактинемії призводив до синтезу усіх досліджуваних білків (див.табл. 1, групи 2,3; $P < 0,02$). Вміст пролактину у плазмі крові через 10 діб після введення лактину становив $9,02 \text{ нмоль/л} \pm 0,51 \text{ нмоль/л}$, що значно перевищувало показники концентрації пролактину у тварин, яким вводили дистильовану воду – $3,01 \text{ моль/л} \pm 0,40 \text{ нмоль/л}$.) При цьому концентрація у білках ядерного соку та негістонових білків знижується, гістонових – не змінюється, а цитоплазматичних – збільшується. Можливо, що у перших двох групах білків (глобулін і негістонові білки) під впливом пролактину разом з уповільненням синтезу прискорюється катаболізм, в той час, як розпад гістонових і цитоплазматичних білків – зменшується.

На відміну від ефектів води, введення олії або не впливало на активність синтезу клітинних білків ПЗ (глобуліни, негістонові білки), або зменшувало її (гістонові, цитоплазматичні білки) і призводило до зменшення концентрації глобулінів і гістонових білків, не змінюючи показники негістонових та цитоплазматичних білків.

Уведення тестостерону пропіонату викликало підвищення концентрації всіх білків, які ми вивчали (див.табл. 2, групи 4,5; $P < 0,05$). При цьому включення продуктів



Вплив тестостерону пропіонату на масу передміхурової залози за умов гіпо- або гіперпролактинемії. 1 – контроль; 2 – вода; 3 – пролактин; 4 – олія; 5 – тестостерону пропіонат; 6 – вода та олія; 7 – пролактин і тестостерону пропіонат; 8 – парлодел; 9 – парлодел і тестостерону пропіонат. * достовірні зміни щодо відповідного контролю.

Таблиця 1. Вплив тестостерону пропіонату на активність включення продуктів ^{14}C -гідролізату (Бк/мг) у клітинні білки передміхурової залози за умов гіпо- та гіперпролактинемії; $\bar{x} \pm S_x$; n = 9)

Схема досліджу	Глобуліни	Гістонові білки	Негістонові білки	Цитоплазматичні білки
1. Контроль	2840±665	6981±886	5973±813	5787±886
2. Введення води	10242±907*	13048±1433*	12717±2615*	9235±632*
3. Введення пролактину	1386±320**	4304±340**	4591±575**	4566±424**
4. Введення олії	2233±212	2569±371*	5305±915	2148±431*
5. Введення тестостерону пропіонату	2632±184	4205±448**	2808±463**	7876±826**
6. Введення води та олії	815±184*	7235±714	8222±926*	975±221*
7. Введення пролактину та тестостерону пропіонату	427±147**	8048±850	3569±479**	6162±923**
8. Введення парлоделу	1832±386	2903±107*	5417±600	5351±454
9. Введення парлоделу та тестостерону пропіонату	3434±380***	4478±365***	9814±1311***	13110±1314***

Примітка. Тут і в табл. 2 вірогідність різниці P (< 0,05 – 0,001) між показниками різних груп: * з показниками 1-ї групи; ** дослід з відповідним контролем; *** між групами 8 та 9.

^{14}C -гідролізату білка у гістонових та цитоплазматичних білків збільшувалось, у білка ядерного соку – не змінювалось, а в негістонових білків – зменшувалось. Отже, можна припустити, що сповільнення процесів катаболізму відбувалося в усіх випадках, але по-різному.

Результати, отримані після послідовного введення тваринам води та кісточкової олії яскраво демонструють здатність олійного розчину зменшувати стимулювальний ефект води на активність синтезу клітинних білків.

При введенні тестостерону пропіонату на тлі пролактану концентрація негістоно-

Таблиця 2. Вплив тестостерону на концентрацію клітинних білків передміхурової залози (мг/г тканини) за умов гіпо- та гіперпролактинемії ($\bar{x} \pm S_x$; n = 9)

Схема досліджу	Глобуліни	Гістонові білки	Негістонові білки	Цитоплазматичні білки
1. Контроль	3,57±0,35	5,24±0,49	10,08±2,87	24,51±2,91
2. Введення води	4,80±0,30*	5,27±0,27	9,90±0,64	10,39±1,60*
3. Введення пролактину	3,68±0,27**	4,96±0,4	6,72±0,94**	16,74±2,01**
4. Введення олії	1,73±0,15*	3,74±0,09*	12,11±1,04	20,13±2,58
5. Введення тестостерону пропіонату	3,15±0,33**	4,50±0,34**	17,03±1,55**	28,13±2,76**
6. Введення води та олії	4,24±0,81	5,27±0,51	3,12±0,78*	36,76±5,68*
7. Введення пролактину та тестостерону пропіонату	1,15±0,27**	3,09±0,37**	6,75±1,83**	18,13±1,53**
8. Введення парлоделу	8,53±0,90*	5,83±0,38	11,44±1,27	17,16±0,87*
9. Введення парлоделу та тестостерону пропіонату	4,55±0,35***	5,97±0,74	0,83±0,14***	16,56±1,58

вих білків підвищується (див.табл. 2, групи 6,7; $P<0,05$), незважаючи на зниження активності їх синтезу (див.табл. 1, групи 6,7; $P<0,05$), а усіх інших білків знижується, хоча синтез виразно гальмується тільки в групі глобулінів (див.табл. 2, групи 6,7; $P<0,05$). Отримані результати вказують на те, що при гіперпролактинемії надлишок тестостерону більше сприяє катаболічним процесам у системі геномних та цитоплазматичних білків ПЗ, ніж анаболічним, як це відбувається при введенні гормону тваринам з нормальним вмістом пролактину. Слід відмітити, що наявність надлишку останнього не змінює характер впливу тестостерону на негістонові білки.

Гіпопролактинемія не впливає на концентрацію негістонових білків (див.табл. 2, групи 1,8; $P<0,05$). У глобулінів і гістонів вона викликає сповільнення процесів катаболізму, тому що, незважаючи на зниження синтезу цих білків, їх концентрація підвищується. Лише у цитоплазматичних білків спостерігається збільшення розпаду, тому що їх синтез не змінюється, а концентрація зменшується.

Уведення тестостерону пропіонату на тлі гіпопролактинемії викликає посилення включення продуктів ^{14}C -гідролізату білка в усі білки (див.табл. 1, групи 8,9; $P<0,05$). Концентрація глобулінів і негістонових білків при цьому впливі зменшується, а у гістонів та цитоплазматичних білків не змінюється (див.табл. 2, групи 8,9). Певно, дія андрогену у цьому випадку полягає в прискоренні розпаду всіх досліджуваних білків.

ВИСНОВКИ

1. В інтактному організмі введення тестостерону пропіонату сповільнює процеси катаболізму глобулінових та негістонових білків передміжурової залози.

2. При нестачі в організмі пролактину тестостерон пропіонат викликає посилення синтезу досліджуваних білків ПЗ, яке не

супроводжується збільшенням їх концентрації, що пов'язано з одночасною активацією їх розпаду.

3. Уведення тестостерону пропіонату за умов гіперпролактинемії призводить до зменшення концентрації всіх білків, крім негістонових, що вказує на посилення їхнього катаболізму.

T. V. Bondarenko

PECULIARITIES OF TESTOSTERONE INFLUENCE ON ACTIVITY OF PROSTATE CELLS' PROTEINS SYNTHESIS UNDER CONDITIONS OF HYPO- AND HYPERPROLACTINEMIA

The influence of testosterone on the concentration and synthesis of nuclear and cytoplasmic prostate proteins were studied in rats with hypo- and hyperprolactinemia. Hyperprolactinemia was induced by "Lactin", and the hypoprolactinemia was modelled by "Parlodel". The rats were injected with ^{14}C -protein hydrolysate i.p. for the investigation of the proteins biosynthesis and concentration of prostate cells. The androgen inhibited catabolism of nonhistone proteins and the proteins of nuclear juice in intact rats organism. Testosterone increased the synthesis of all proteins in rats with prolactine deficiency, but this enlarge was not connected with an elevation of their concentration. Thus, we suggest that in this case the proteins disintegration may be increased. Under hyperprolactinemia the concentration of all proteins, besides nonhistone proteins, was declined that reflected the enhancement their catabolism.

V. Danilevsky Institute of Endocrine Pathology Problems at AMS of Ukraine, Kharkov

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Закс Л. Статистическое оценивание. – М.: Статистика, 1976. – 598 с.
2. Збарский И.Б. Организация клеточного ядра. – М.: Медицина, 1988. – 336 с.
3. Збарский И.Б., Георгиев Г.П. Новые данные по фракционированию клеточных ядер печени крысы и химическому составу ядерных структур // Биохимия. – 1959. – 24, № 2. – С. 192.
4. Прокофьева-Бельговская А.А. Значение негистоновых белков в преобразованиях и генетическом функционировании хромосом // Молекуляр. биология. – 1982. – 16, № 4. – С. 771 – 781.
5. Романов Г.А., Соколова Н.А., Розен В.Б. и др. Взаимодействие дексаметазон-рецепторных комплексов с ядрами печени крысы и с ДНК // Биохимия. – 1976. – 41, № 12. – С. 2140 – 2144.
6. Уманский С.Р., Токарская В.И., Зотова В.А. и др. Выделение и гетерогенность негистоновых белков

- хроматина печени крысы // Молекуляр. биология. – 1971. – **5**, № 2. – С. 270 – 279.
7. An W., van Holde K., Zlatanova J. The non-histone chromatin protein HMG1 protects linker DNA on the side opposite to that protected by linker histones // J. Biol. Chem. – 1998. – **273**, № 41. – P. 26289 – 291.
 8. Baranao J., Legnani B., Chiauuzzi V. et al. Effects of prolactin on androgen metabolism in androgen target tissues of immature rats // Endocrinology. – 1981. – **109**, № 6. – P. 2188 – 2195.
 9. Hiremath S.T., Maciewicz R.A., Wang T.Y. The loosely bound non-histone chromosomal proteins of rat prostate in androgen action // Biochim. and Biophys. Acta. – 1981. – **653**, № 1. – P. 130 – 138.
 10. Johns E.W., Butler J. Further fractionation of histones from calf thymus // Biochem. J. – 1962. – **82**, № 1. – P. 15 – 18.
 11. Kabler R.L., Srinivasan A., Taylor L.J. et al. Androgen regulation of ribosomal RNA synthesis in LN-CaP cells and rat prostate // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. – 1996. – **59**, № 5–6. – P. 431–439.
 12. McPherson S. J., Wang H., Jones M. E. et al. Elevated Androgens and Prolactin in Aromatase-Deficient Mice Cause Enlargement, But Not Malignancy, of the Prostate Gland // Endocrinology. – 2001. – **142**. – P. 2458 – 2467.
 13. Okuda Y., Fujisawa M., Matsumoto O., Kamidono S. Testosterone dependent regulation of the enzymes involved in DNA synthesis in the rat ventral prostate // J. Urol. – 1991. – **145**, № 1. – P. 188 – 191.
 14. Orensfein J.M., March W.H. Incorporation in vivo of methionine and ethionin into the methylation and ethylation of rat liver nuclear proteins // Biochem. J. – 1968. – **109**. – P. 697 – 699.
 15. Perez-Villamil B., Bordiu E., Puente-Cueva M. Involvement of physiological prolactin levels in growth and prolactin receptor content of prostate glands and testes in development male rats // J. Endocrinol. – 1992. – **132**. – P. 449 – 459.
 16. Rui H., Haug E., Mevag B., Thomassen Y., Purvis K. Short-term effects of prolactin on prostatic function in rats with lisuride-induced hyperprolactinaemia // J. Reprod. and Fertil. – 1985. – **75**, № 2. – P. 421 – 432.
 17. Sluysen M. Effect of testosterone on the binding of prostate histone to DNA in vitro // Biochem. and biophys. Res. Commun. – 1966. – **22**, № 3. – P. 336 – 339.
 18. Strick, R. Laemmli, U.K. SARs are cis DNA elements of chromosome dynamic synthesis of a SAR repressor protein // Cell. – 1995. – **83**. – P. 1137 – 1148.
 19. Van Coppenolle F., Slomianny C., Carpentier F. et al. Effects of hyperprolactinemia on rat prostate growth: evidence of androgen-dependence // Amer. J. Physiol. Endocrinol. Metab. – 2001. – **280**. – P. E120 – E129.
 20. Wennbo H., Kindblom J., Isaksson O.G., Tornell J. Transgenic mice overexpressing the prolactin gene develop dramatic enlargement of the prostate gland // Endocrinology. – 1997. – **138**, №10. – P. 4410 – 4415.
 21. Zhang Cai-Qiao, Zhuang Lin-Zhi, Yang Chuan-Ren. Влияние ПРЛ на образование кислой фосфотазы и дигидротестостерона в эпителиальных клетках ПЖ половозрелых крыс // Dongwu xuebao=Acta zool. sin. – 1994. – **40**, №4. – P. 264 – 267.

*Ин-т проблем ендокрин. патології
ім. В.Я. Данилевського АМН України, Харків*

*Матеріал надійшов
до редакції 09.08.2002*