

Przydatność wybranych wskaźników enzymatycznych prostaty psa do oceny zmian jej funkcji pod wpływem finasterydu

RAFAŁ STRZEŻEK, TOMASZ JANOWSKI*

Katedra Biochemii i Biotechnologii Zwierząt Wydziału Bioinżynierii Zwierząt UWM, ul. Oczapowskiego 5, 10-718 Olsztyn
*Zespół Rozrodu Zwierząt Katedry Nauk Klinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM,
ul. Oczapowskiego 14, 10-957 Olsztyn

Strzeżek R., Janowski T.

Efficacy of enzyme markers for assessing dog prostate function following finasteride administration

Summary

The aim of the study was to investigate the relationship between administering finasteride (Proscar), an inhibitor of 5 α -reductase, and the activity of acid phosphatase and specific arginine esterase, which reflect the state of dog's prostates. The study was carried out on 14 adult clinically healthy mixed dogs. Experimental dogs were given p.o. finasteride at a dosage of 1 mg/kg/d for 12 weeks, control animals received a placebo. Endocrinological investigations of blood plasma determined the levels of testosterone (T) and dihydrotestosterone (DHT). The activity of acid phosphatase and arginine esterase was, however, determined in the prostatic secretion (third fraction of ejaculate).

The long-term administration of finasteride (12 weeks) caused a gradual decline in the secretory activity of prostate, which was manifested in a marked reduction of the volume of the prostate fraction. There were no significant changes in testosterone concentration. However, there was a marked decline in DHT concentration (more than 60%), which was accompanied by a reduction in acid phosphatase and arginine esterase activity. These enzymes returned to their normal activity following the cessation of finasteride administration and after the prostate showed normal physiological function. Individual differences regarding the animals reaction prostate suppression were observed within the range of the analyzed biochemical and endocrinological markers.

Keywords: dog, benign prostatic hyperplasia, finasteride, enzymes

Stan i funkcja prostaty u psów są określane głównie w oparciu o kliniczną ocenę tego narządu, uzupełnianą badaniem ultrasonograficznym lub biopsją (11). Dodatkowo określa się objętość i charakter wydzieliny sterczu (11), natomiast jej biochemiczna ocena jest stosowana tylko niekiedy (2, 6, 12).

W wydzielinie gruczołu krokowego psów występuje białko o właściwościach enzymatycznych, tzw. psia prostatowa specyficzna esteraza (CPSE), nazywana także esterazą argininową (2, 8, 9). Omawiany enzym stanowi około 90% białek wydzielanych przez stercz i jest podobny do ludzkiego prostatowego specyficznego antygenu (PSA) (9). Niektórzy autorzy wskazują na możliwość wykorzystania aktywności CPSE jako diagnostycznego wskaźnika funkcji prostaty (19).

Innym enzymatycznym markerem oceny stanu i funkcji prostaty jest fosfataza kwaśna. U psów zdrowych aktywność prostatowej frakcji (PAP) oraz aktywność całkowita enzymu (TAP) wzrastają wraz z wiekiem, co sugeruje, że enzym ten ma związek ze stanem prostaty (6, 7). Istnieją sugestie, że oznaczanie aktywności TAP i PAP w surowicy krwi także może być użytecznym wskaźnikiem do diagnozowania stanów patologicznych prostaty u psów (12).

Łagodny rozrost prostaty (BPH – benign prostatic hypertrophy), czyli nienowotworowe powiększenie gruczołu, występuje powszechnie u niekastrowanych psów samców w wieku powyżej 6 lat (3). Przyczyną tego stanu są zaburzenia przemian androgenów, zaś za główny mediator tego procesu jest uważany dihydrotestosteron (10).

Leczenie łagodnego rozrostu prostaty polega generalnie na eliminowaniu lub blokowaniu negatywnego wpływu androgenów na ten narząd (1). Jedną z nowszych metod terapii jest stosowanie finasterydu. Substancja ta jest pochodną 4-azasteroidu, zaś jej mechanizm działania opiera się na blokowaniu enzymu 5 α -reduktazy, odpowiedzialnego za konwersję testosteronu w jego formę aktywną – dihydrotestosteron (10, 13). We wcześniejszych badaniach własnych wykazano hamujący wpływ finasterydu na czynność prostaty (20). Finasteryd poprzez swoje działanie daje szansę na prowadzenie badań modelowych nad czynnością prostaty, także z możliwością wykorzystania wskaźników enzymatycznych.

Celem badań było określenie zależności między zmieniającą się pod wpływem finasterydu funkcją prostaty a aktywnością wybranych enzymów w nasieniu charakteryzujących jej stan.

Materiały i metody

Badania przeprowadzono na 14 psach mieszańcach w wieku od 2 do 10 lat, cechujących się stanem fizjologicznym lub niewielkiego stopnia rozrostem gruczołu krokowego. Zwierzęta były utrzymywane w boksach, karmione raz dziennie komercyjną suchą karmą (Friskies® Purina), a ponadto miały zapewniony dostęp do wody *ad libitum*. Psy były stale pod pełną opieką weterynaryjną. Zwierzęta były utrzymywane zgodnie z zaleceniami Lokalnej Komisji Etycznej.

Sześć samców otrzymujących finasteryd (MK-906; N-(2-methyl-2-propyl)3-oxo-4-aza-5 α -androst-1-ene-17 β -carboxamide; Proscar; Merck Sharp and Dohme) stanowiło grupę doświadczalną, natomiast 8 otrzymujących placebo tworzyło grupę kontrolną. Zwierzęta do poszczególnych grup były wybierane losowo. Psom grupy doświadczalnej preparat w formie tabletek podawano *per os* w dawce 1 mg/kg m.c./dzień. Tabletki były wprowadzane do gardła za pomocą medycznego aplikatora. Masa ciała psów była kontrolowana raz w tygodniu. Preparat podawano przez 12 tygodni. Po zaprzestaniu podawania finasterydu doświadczenie kontynuowano przez następne 6 tygodni, prowadząc obserwacje kliniczne i badania laboratoryjne. Łączny okres trwania doświadczenia, wliczając w to 3-tygodniowy okres poprzedzający aplikację leku, wyniósł 21 tygodni.

W obu grupach zwierząt co 7 dni określano objętość wydzieliny prostaty oraz aktywność enzymatycznych wskaźników stanu tego narządu – fosfatazy kwaśnej i esterazy argininowej. Ponadto oceniano koncentrację testosteronu i dihydrotestosteronu. Użyto przy tym następujących metod.

Ocena objętości wydzieliny prostaty. Ejakulatory do badań pobierano metodą masturbacji w obecności suki w cieczce. Frakcje III ejakulatu (wydzielina prostaty) zbierano oddzielnie do ogrzanych sterylnych naczyń szklanych. Ocenę objętości wydzieliny prostaty dokonywano w wyskalowanych probówkach.

Oznaczenie aktywności fosfatazy kwaśnej w wydzielinie prostaty. Do badań wykorzystano p-nitrofenylofosforan disodowy jako substrat (4). Próby właściwe kolorymetrowano wobec prób kontrolnych przy długości fali 410 nm. Aktywność enzymu w jednostkach Bessey-Lowry'ego-Brocka odczytywano z krzywej wzorcowej. Uzyskane wyniki obliczano w jednostkach międzynarodowych (U), stosując współczynnik przeliczeniowy 16,67 (4).

Oznaczenie aktywności esterazy argininowej w wydzielinie prostaty. Jako substrat wykorzystano 0,001 M N α -benzoyl-L-arginine ethyl ester (BAEE) (Sigma, B-4500) zawieszony w 0,05 M buforze TRIS-HCl z dodatkiem 5% CaCl₂ (7). Pomiarów absorbancji dokonywano w odstępach 30-sekundowych w ciągu 2 minut w temperaturze 25°C przy długości fali 254 nm (w stosunku do próby ślepej) z wykorzystaniem spektrofotometru Beckman DU-62. Aktywność enzymu obliczano wg wzoru: $\Delta E_{254}/0,359 = \text{ilość } \mu\text{M substratu zhydrolizowanego przez enzym w ciągu 1 minuty}$ (ΔE_{254} – przyrost absorbancji w ciągu 1 minuty, 0,359 – współczynnik). Aktywność właściwą enzymu określano w przeliczeniu na 1 mg białka.

Badania endokrynologiczne. Próbkę krwi do określenia poziomu testosteronu i dihydrotestosteronu pobierano z żyły odpromieniowej, każdorazowo po zakończeniu badań klinicznych i pobraniu ejakulatu. Używano jednorazowych igieł Micropoint 0,9 \times 40 oraz sterylnych probówek z heparyną (Venoject®). Pobrane próby były natychmiast wirowane przez 20 minut przy 3000 obr./min. Uzyskane osocze przenoszono

do sterylnych probówek i do czasu analiz przechowywano w temperaturze -20°C.

Oznaczenie poziomu testosteronu. Poziom testosteronu mierzono metodą radioimmunologiczną bez ekstrakcji z wykorzystaniem RIA Kits DSL – 4000 (Diagnostic Systems Laboratories Inc, Webster, Tex, USA). Próby wykonywano w dwóch powtórzeniach. Radioaktywność zliczano przy pomocy licznika scyntylicji Wallac Wizard 1470.

Czułość metody wynosiła 0,1 ng/ml, zaś zmienność wewnątrz- i zewnątrzserijna odpowiednio 3,75% i 7,28%.

Oznaczenie poziomu dihydrotestosteronu. Poziom dihydrotestosteronu oznaczono metodą radioimmunologiczną z ekstrakcją n-heksanem z wykorzystaniem RIA Kits DSL-9600 (Diagnostic System Laboratories Inc, Webster, Tex, USA). Próby wykonywano w dwóch powtórzeniach.

Radioaktywność zliczano przy pomocy licznika scyntylicji Wallac Wizard 1470.

Czułość metody wynosiła 30 pg/ml, zaś zmienność wewnątrz- i zewnątrzserijna odpowiednio 2,88% i 9,09%.

Analiza statystyczna. Z uwagi na dużą osobniczą zmienność uzyskanych rezultatów badań do wnioskowania statystycznego przyjęto poziom istotności $p = 0,1$. Zastosowano metodę analizy korelacji i regresji. Przyjęto model krzywoliniowy (wielomian 2 stopnia). Dla grupy eksperymentalnej i kontrolnej określono istnienie istotnej zależności (korelacje) lub jej brak pomiędzy badanymi cechami a długością okresu stosowania finasterydu. Przy pomocy testu F zweryfikowano hipotezę o podobnym przebiegu zmian w okresie doświadczenia w grupie eksperymentalnej i kontrolnej.

Obliczenia wykonano przy użyciu programów komputerowych Excel oraz Statistica.

Wyniki i omówienie

Ryciny 1-5 przedstawiają zmiany koncentracji lub aktywności badanych wskaźników w przebiegu doświadczenia. W grupie eksperymentalnej stwierdzono istotną zależność pomiędzy czasem podawania finasterydu a objętością wydzieliny prostaty, aktywnościami fosfatazy kwaśnej i esterazy argininowej oraz poziomami testosteronu i dihydrotestosteronu. Wykazano ponadto, że z wyjątkiem poziomu testosteronu, istnieją istotne różnice pomiędzy grupą doświadczalną a kontrolną w zakresie badanych wskaźników (ryc. 1-5).

W tabeli 1 przedstawiono wartości współczynników korelacji między analizowanymi wskaźnikami funkcji prostaty a poziomem androgenów – testosteronu i dihydrotestosteronu. Należy stwierdzić, że generalnie wartości współczynników korelacji były dodatnie i statystycznie istotne ($p = 0,1$). Zależności nie wykazano jedynie między objętością wydzieliny prostaty i poziomem testosteronu (tab. 1).

Uzyskane wyniki wskazują, że długotrwałe podawanie finasterydu obniża funkcję sekrecyjną prostaty oraz zmienia istotnie poziom dihydrotestosteronu. Wyrazem tego było znaczne zmniejszenie objętości frakcji prostatowej nasienia obserwowane w przebiegu doświadczenia. Potwierdza to hamujący wpływ tej substancji na czynność prostaty oraz mechanizm działania stwierdzone także przez innych autorów (10, 13, 16, 18) oraz we wcześniejszych badaniach własnych (20).

Badania własne potwierdziły mechanizm działania finasterydu na poziomie syntezy hormonów androgeno-

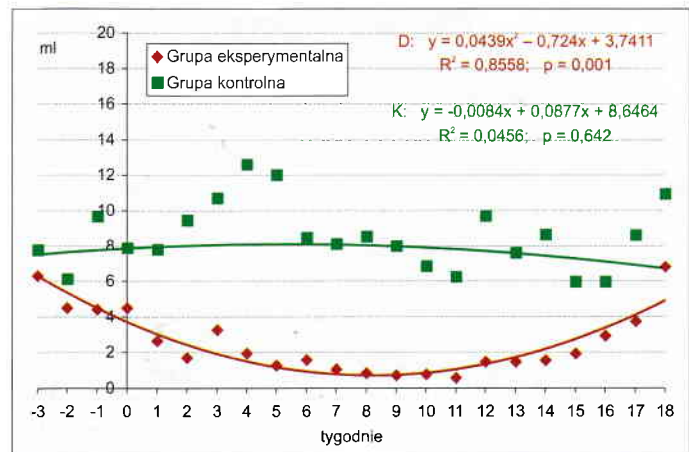
Tab. 1. Współczynniki korelacji liniowej ($p = 0,1$) między wybranymi wskaźnikami funkcji prostaty a poziomem androgenów (grupa eksperymentalna)

	DHT	T
Objętość wydzieliny prostaty	0,62	-
Fosfataza kwaśna	0,67	0,72
Esteraza argininowa	0,29	0,48

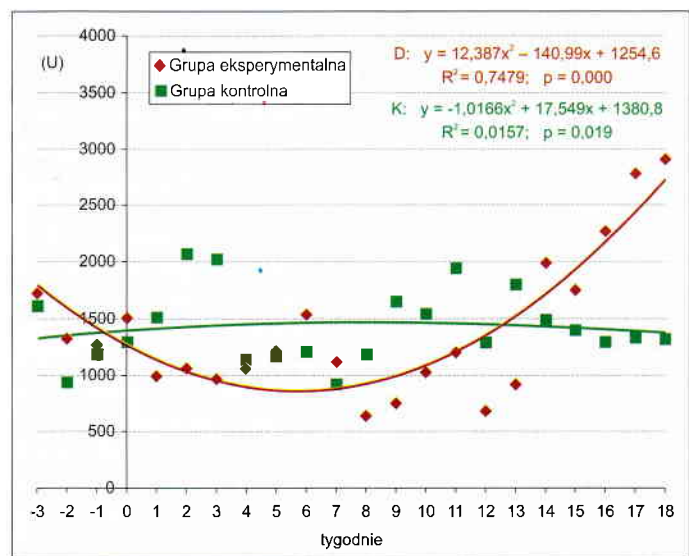
wych. Koncentracja testosteronu u psów grupy eksperymentalnej była niezmienną, natomiast stwierdzono znaczne (ponad 60%) obniżenie poziomu DHT, przy dużym zróżnicowaniu osobniczym. Uzyskane wyniki korespondują z badaniami Cohena i wsp. (5) którzy u psów z BPH notowali obniżenie DHT o 65% po 15 tygodniach podawania finasterydu zastosowanego w analogicznej dawce jak w badaniach własnych. Sirinarumitri i wsp. (18) stosując niższe dawki finasterydu (0,1-0,5 mg/kg) także obserwowali istotne obniżenie poziomu DHT (58%).

Opisanym powyżej zmianom, a następnie ich powrotowi do wartości wyjściowych, towarzyszyło analogiczne zachowanie się aktywności badanych enzymów. W przypadku fosfatazy kwaśnej generalnie stwierdzono, że obniżenie aktywności tego enzymu korelowało ze zmniejszeniem się objętości wydzieliny prostaty oraz spadkiem poziomu DHT. Po zaprzestaniu podawania finasterydu i powrocie prostaty do fizjologicznej funkcji, aktywność tego enzymu wracała do wartości wyjściowych. Opisana reakcja nie była jednolita u wszystkich zwierząt. U 2 osobników bowiem w okresie pierwszych 7-8 tygodni podawania finasterydu aktywność fosfatazy kwaśnej w wydzielinie prostaty nie wykazywała istotnych zmian. To nietypowe zjawisko wskazywać może na osobnicze reakcje zwierząt w warunkach obniżonej aktywności sekrecyjnej prostaty. Należy podkreślić, że w odróżnieniu od wcześniejszych prac wykonanych na psach rasowych (10, 15, 17, 18) w badaniach własnych użyto psów mieszańców. Być może warunkowało to obserwowaną różnorodność osobniczych reakcji enzymatycznych w warunkach zmieniającej się czynności prostaty. Statystycznie, analizując średnie wartości dla całej grupy, stwierdzono jednak istotną zależność między aktywnością fosfatazy a funkcją prostaty (tab. 1).

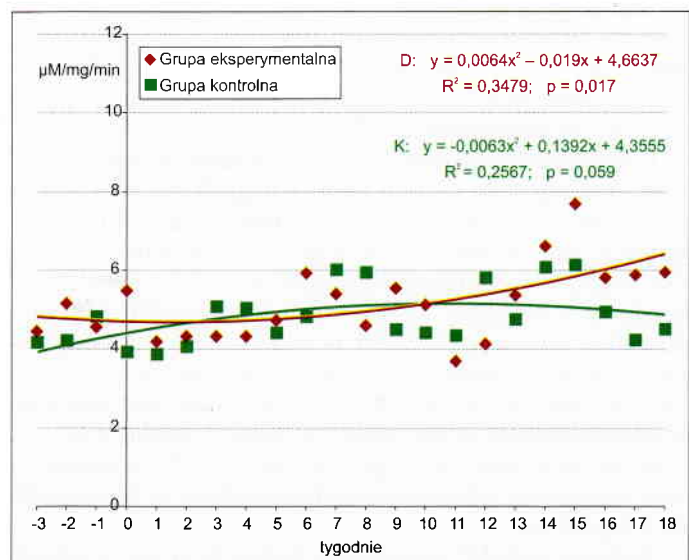
Interpretacja wyników dotyczących drugiego badanego enzymu, esterazy argininowej jest trudniejsza, bowiem w porównaniu z fosfatazą kwaśną korelacja między funkcją prostaty a aktywnością tego enzymu jest słabiej zaznaczona (tab. 1). Podobnie jak w przypadku fosfatazy kwaśnej, obserwowano również osobnicze różnice aktywności tego enzymu oraz różne reakcje poszczególnych zwierząt na supresję czynności prostaty. Stopniowe obniżenie aktywności tego enzymu wraz z upływem czasu podawania finasterydu, stwierdzono bowiem u 4 osobników. U dwóch pozostałych psów, do 9.-10. tygodnia podawania preparatu, mimo obniżonej funkcji sekrecyjnej prostaty, obserwowano nawet wzrost aktywności esterazy argininowej. Zaburzenia w oddawaniu ejakulatów u wymienionych osobników utrudniały dalszą analizę tego zjawiska. Generalnie jednak, podobnie jak w przypadku fosfatazy kwaśnej, uzyskane w badaniach własnych wyniki mimo pewnych rozbieżności, potwierdzają, jak



Ryc. 1. Wpływ podawania finasterydu na objętość frakcji prostatowej (III) ejakulatu

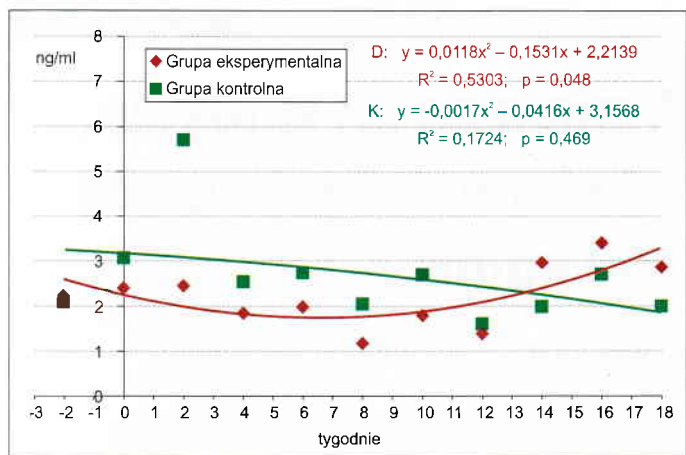


Ryc. 2. Wpływ podawania finasterydu na aktywność fosfatazy kwaśnej w wydzielinie prostaty

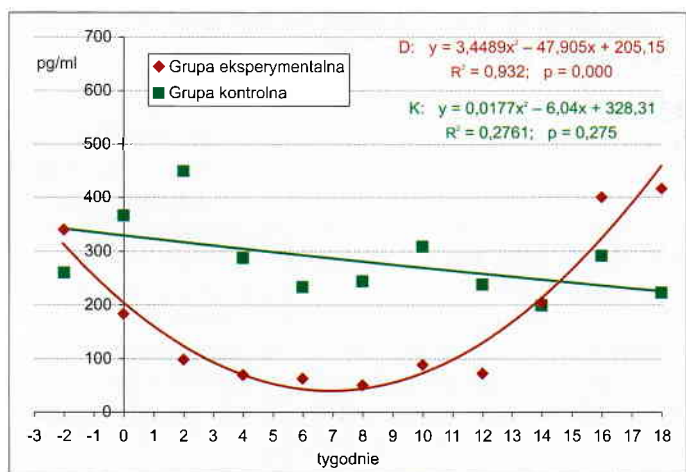


Ryc. 3. Wpływ podawania finasterydu na aktywność esterazy argininowej w wydzielinie prostaty

się wydaje, zależność aktywności esterazy argininowej od stanu prostaty i wpływu na nią androgenów (tab. 1). Korelacja taka dotycząca aktywności tego enzymu



Ryc. 4. Wpływ podawania finasterydu na poziom testosteronu w osoczu krwi



Ryc. 5. Wpływ podawania finasterydu na poziom dihydrotestosteronu w osoczu krwi

w tkankach była również opisana wcześniej przez innych autorów (9, 14, 15). Porównanie aktywności obu badanych enzymów wskaźnikowych prostaty wykazało statystycznie istotną zależność istniejącą między nimi ($r = 0,31$, $p = 0,1$), co dodatkowo wspiera tezę o ich ścisłym związku z funkcją prostaty.

Wyniki własne dowodzą, że istnieje zależność między aktywnością badanych enzymów a zmieniającą się pod wpływem androgenów funkcją prostaty. Należy jednak zaznaczyć, iż u niektórych zwierząt korelacja ta była słabo zaznaczona. Niniejsze badania były przeprowadzone u zwierząt zdrowych z eksperymentalnie blokową czynnością prostaty, która następnie wracała do prawidłowej funkcji. Badania innych autorów dotyczyły natomiast stanów patologicznych tego organu i dowiodły, iż aktywności fosfatazy kwasnej i esterazy argininowej mogą być podwyższone w stanach łagodnego rozrostu prostaty (2, 6, 12). Jednakże dotychczas publikowane prace dotyczące tej problematyki są bardzo nieliczne, dodatkowo zaś dotyczą niewielkiej liczby zwierząt. Ponadto, w większości prac, oznaczeń aktywności badanych enzymów dokonano w surowicy krwi (2, 6, 12) lub tkankach prostaty (14, 15), zaś nieliczne tylko przeprowadzono w płazmie nasienia (2). Utrudnia to znacznie porównanie wyników własnych z badaniami innych autorów. Ciekawą obserwacją stanowi natomiast fakt, iż u psów przydatniejszym

wskaźnikiem wydaje się fosfataza kwasna. Natomiast w medycynie ludzkiej enzymem powszechnie używanym w diagnostyce stanu prostaty jest PSA, który jest w dużym stopniu podobny do esterazy argininowej CPSE.

Wyniki własne wskazują na przynajmniej częściową przydatność określania aktywności badanych enzymów w nasieniu do celów diagnostycznych. Dalsze prace prowadzone na większej liczbie zwierząt z różnym stanem prostaty wydają się niezbędne, aby uzyskać ostateczną odpowiedź dotyczącą przydatności wskaźników enzymatycznych do diagnozowania stanu tego organu.

Piśmiennictwo

- Bamberg-Thalen B., Linde-Forsberg C.: The effects of medroxyprogesterone acetate and ethinylestradiol on hemogram, prostate, testes and semen quality in normal dogs. *J. Vet. Med. A.* 1992, 39, 264-270.
- Bell F. W., Klausner J. S., Hayden D. W., Lund E. M., Liebenstein B. B., Feeney D. A., Johnston S. D., Shivers J. L., Ewing Ch. M., Isaacs W. B.: Evaluation of serum and seminal plasma markers in the diagnosis of canine prostatic disorders. *J. Vet. Intern. Med.* 1995, 9, 149-153.
- Berry S. J., Strandberg J. D., Saunders W. J.: Development of canine benign prostatic hyperplasia with age. *Prostate* 1986, 9, 363-373.
- Bessey O. H., Lowry O. H., Brock M. J.: A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J. Biol. Chem.* 1946, 164, 321-323.
- Cohen S. M., Werrmann J. G., Rasmusson G. H.: Comparison of the effects of new specific azasteroid inhibitors of steroid 5 α -reductase on canine hyperplastic prostate: Suppression of prostatic DHT correlated with prostate regression. *Prostate* 1995, 26, 55-71.
- Corazza M., Guidi G., Romagnoli S., Tognetti R., Buonaccorsi A.: Serum total prostatic and non-prostatic acid phosphatase in healthy dogs and in dogs with prostatic diseases. *J. Small. Anim. Pract.* 1994, 35, 307-310.
- Dube J. Y., Chapdelaine P., Tremblay R. R., Thabet M., Roy R.: Synthesis of acid phosphatase and other proteins by human prostatic tissue in vitro. *Can. J. Biochem. Cell. Biol.* 1984, 62, 555-558.
- Frenette G., Dube J. Y., Tremblay R. R.: Enzymatic characterization of arginine esterase from dog seminal plasma. *Biochim. Biophys. Acta* 1985, 838, 270-276.
- Gobello C., Castex G., Corrada: Serum and seminal markers in the diagnosis of disorders of the genital tract of the dog: a mini-review. *Theriogenology* 2002, 57, 1285-1291.
- Iguer-Ouada M., Versteegen J. P.: Effect of finasteride (Proscar MSD) on seminal composition, prostate function and fertility in male dogs. *J. Reprod. Fert.* 1997, Suppl. 51, 139-149.
- Jaworek A., Boryczko Z., Gajewski Z., Katkiewicz M.: Etiologia, rozpoznawanie i leczenie chorób gruczołu krokowego u psów. *Mat. VI Polsko-Niemieckie Sympozjum z zakresu Fizjologii i Patologii Rozrodu Zwierząt, Problemy rozrodu i choroby psów i kotów*, Warszawa 16.09.2000, s. 41-53.
- Jaworek A., Boryczko Z., Katkiewicz M., Gajewski Z., Strzeżek J.: Evaluation of various techniques in diagnostic of canine prostatic diseases. *ESDAR Newsletter. 5th Ann. Conf. Europ. Soc. Dom. Anim. Reprod.* Vienna 13-15 September 2001, s. 41.
- Johnston S. D., Kamolpatana K., Root-Kustring M. V., Johnston G. R.: Prostatic disorders in the dog. *Anim. Reprod. Sci.* 2000, 60-61, 405-415.
- Juniewicz P. E., Barbolt T. A., Egy M. A., Frenette G., Dube J. Y., Tremblay R. R.: Effects of androgen and antiandrogen treatment on canine prostatic arginine esterase. *Prostate* 1990, 17, 101-111.
- Juniewicz P. E., Hoekstra S. J., Lemp B. M., Barbolt T. A., Devin J. A., Gauthier E., Frenette G., Dube J. Y., Tremblay R. R.: Effect of combination treatment with Zanterone (WIN 49596), a steroidal androgen receptor antagonist, and Finasteride (MK-906), a steroidal 5 α -reductase inhibitor, on the prostate and testes of beagle dogs. *Endocrinology* 1993, 133, 904-913.
- Kamolpatana K., Johnston S. D., Hardy S. K., Castner S.: Effect of finasteride on serum concentrations of dihydrotestosterone and testosterone in three clinically normal sexually intact adult male dogs. *AJVR* 1998, 59, 762-764.
- Lange K., Cordes E. K., Hoppen H.-O., Gunzel-Apel A. R.: Determination of concentrations of sex steroids in blood plasma and semen of male dogs treated with delmadinone acetate or finasteride. *J. Reprod. Fert.* 2001, Suppl. 57, 83-91.
- Sirinarumit K., Johnston S. D., Kustring M. V., Johnston G. R., Sarkar D. K., Memon M. A.: Effects of finasteride on size of the prostate gland and semen quality in dogs with benign prostatic hypertrophy. *Am. Vet. Med. Assoc.* 2001, 218, 1275-1280.
- Shivaji S., Scheit K.-H., Bhargava P. M.: *Proteins of Seminal Plasma*. Wiley, New York 1990.
- Strzeżek R., Janowski T., Barański W.: Wpływ finasterydu na czynność prostaty i jakość nasienia u psów. *Medycyna Wet.* 2004, 60, 211-214.

Adres autora: dr Rafał Strzeżek, ul. Dworcowa 41/90, 10-437 Olsztyn; e-mail: rafi@uwm.edu.pl