

Wpływ testosteronu na koncentrację GSH i aktywność enzymów glutationowych w wątrobie i nerce myszy

GRAŻYNA ŚWIDERSKA-KOŁACZ, KORNELIA NIEMYSKA, BOŻENA WITEK,
JOLANTA KLUSEK, WŁODZIMIERZ MIERZWA*, ADAM KOŁĄTAJ**

Instytut Biologii Akademii Świętokrzyskiej w Kielcach, ul. Świętokrzyska 15, 25-406 Kielce

*Wojewódzki Szpital Specjalistyczny, ul. Białska 104-108, 42-200 Częstochowa

**Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu, Jastrzębiec, ul. Postępu 1, 05-552 Wólka Kosowska

Świdarska-Kołacz G., Niemyska K., Witek B., Klusek J., Mierzwa W., Kołataj A.

Influence of testosterone on GSH concentration and glutathione enzyme activity in the liver and kidney of mice

Summary

Testosterone injections (0.05 mg/kg b.w.) administered over the course of 3 and 5 days revealed the statistically confirmed reactivity of the glutathione transferase (GST) and glutathione peroxidase (GSPx) as well as the changes of reduced glutathione concentration in the liver and kidney of experimental mice. The GSH level and GSPx activity decreased in both organs, in contrast the GST activity increased.

The results permit the hypothesis that exogenous testosterone can change the metabolic rate of cell biochemical processes in these organs.

Keywords: testosterone, glutathione enzymes, mice

Testosteron jest hormonem płciowym męskim z grupy androgenów, syntetyzowanym z cholesterolu (31), odpowiedzialnym za normalny przebieg spermatogenezy oraz rozwój drugorzędnych cech płciowych samców (4). W normalnych warunkach u człowieka gonady męskie produkują 4-7 miligramów testosteronu dziennie (17), z występującym rytmem dobowym wydzielania, najwyższym w godzinach rannych, najniższym wieczorem. Produkcja testosteronu wzrasta gwałtownie na początku okresu dojrzewania i spada równie szybko około 50. roku życia, osiągając 20%-50% szczytowej produkcji w okresie 80. roku życia (12, 15, 16, 20, 32).

Testosteron – poza funkcjami rozrodczymi – wywiera silny wpływ anaboliczny na przemianę białkową, przejawiający się dodatnim bilansem azotowym (13) i zwiększeniem zawartości białka, zwłaszcza w mięśniach, zwiększa też poziom fosforanów i potasu w mięśniach prądkowanych i w mięśniu sercowym oraz zwiększa siłę skurczu mięśni (10, 29, 30). W związku ze stosowaniem w medycynie testosteronu, zmieniającego, między innymi, aktywność metaboliczną tkanek i organów, zwrócono uwagę na glutation regulujący m.in. gospodarkę oksydacyjną (2). Glutathion stał się swoistym markerem stresu oksydacyjnego (1, 5, 8, 11, 19, 27) i może być interpretowany jako istotny wskaźnik aktywności metabolicznej tkanek i narządów (22, 23).

Celem badań było określenie wpływu egzogenego testosteronu podawanego iniekcyjnie na koncentrację glutationu zredukowanego i aktywność jego enzymów – transferazy i peroksydazy glutationowej w wątrobie i nerce myszy jako zwierząt modelowych.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 50 samcach myszy linii Swiss, o masie ciała 20-22 gramy, pochodzących z hodowli Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu, pozostających w wieku 6-9 tygodni. Zwierzęta były utrzymywane w standardowych warunkach hodowli mysiej fermi, w pomieszczeniu o temperaturze 22°C i naturalnym fotoperiodyzmie (12 godzin światła/12 godzin ciemności), miały stały dostęp do wody w postaci automatycznych smoczków z butelkami, wmontowanych w siatkę pokryw klatek, a także fachową opiekę weterynaryjną.

Zwierzęta żywione były granulowaną paszą, wytworzoną w Instytucie Parazytologii PAN w Łomnie k. Warszawy, zawierającą 16% białka i 14,04 MJ/kg energii brutto.

Wszystkie myszy podzielono na odpowiednie grupy doświadczalne, obejmujące po 10 samców każda: grupa I (kontrolna) – otrzymująca parenteralnie olej *pro injectione* w okresie 3 i 5 dni w ilości 250 µl, raz na dobę o godz. 9⁰⁰-9¹⁵; grupa II – otrzymująca testosteron w dawce 0,05 mg/kg m.c. (Testosteronum Propionatum Przedsiębiorstwo Farmaceutyczne Jelfa) w okresie 3 dni, także jeden raz na dobę; grupa III – otrzymująca testosteron analogicznie w dawce 0,05 mg/kg m.c. w okresie 5 dni.

Sześć godzin po ostatniej iniekcji zwierzęta wszystkich grup kontrolnych i doświadczalnych poddane zostały dekapitacji. Bezpośrednio po wykrwawieniu preparowano wątrobę i nerki. Wątrobę poddawano perfuzji oziębionym do +4°C roztworem soli fizjologicznej w celu usunięcia z niej krwi, po czym – podobnie jak nerkę (lewą) – natychmiast homogenizowano w homogenizatorze szklanym Pottera z teflonowym tłokiem, w schłodzonym do +4°C 0,1 M buforze fosforanowym o pH 7,4, zawierającym 10 mM EDTA. Uzyskane homogenaty wirowano przez 10 minut przy 13 000 obr./min., w temperaturze +4°C w wirówce Janetzki'ego K-24. W otrzymanych supernatantach oznaczono poziom glutationu zredukowanego metodą Ellmana (9) oraz aktywność peroksydazy glutationowej wg metody Chiu i wsp. (7) i transferazy glutationowej wg metody Habiga i wsp. (14). Dodatkowo oznaczono poziom białka metodą Lowry'ego i wsp. (25) w modyfikacji Kirschke i Wiederandersa (21).

Otrzymane wyniki poddano obliczeniom statystycznym wg dwuczynnikowej analizy wariancji oraz testu Dun-cana.

Substraty były produkowane przez firmę Sigma, odczynniki analityczne przez firmę Ciech – Gliwice. Eksperyment uzyskał zgodę Uczelnianej Komisji Etyki do Badań nad Zwierzętami Akademii Świętokrzyskiej w Kielcach.

Tab. 1. Koncentracja testosteronu ($\bar{x} \pm SD$) w krwi samców zwierząt kontrolnych oraz po iniekcji hormonu w dawce 0,05 mg/kg masy ciała; n = 10 w obu podgrupach

Koncentracja po iniekcji oleju parafinowego	Koncentracja po iniekcji testosteronu	% wzrostu
60,6 ± 12,1	60,0* ± 25,3	264

Objaśnienie: * p < 0,001

Tab. 2. Koncentracja GSH ($\mu\text{M/g}$ białka) oraz aktywność transferazy glutationowej GST ($\mu\text{M/g}$ białka) i peroksydazy glutationowej GSPx ($\mu\text{M/g}$ białka) w wątrobie samców myszy pod wpływem testosteronu podawanego przez 3 i 5 dni (kontrola = 100%; n = 10; $\bar{x} \pm SD$)

Badane wskaźniki	Kontrola (olej)		Testosteron 3 dni			Testosteron 5 dni		
GSH	4,960	0,600	3,560**	0,400	71,8	3,920*	0,300	79,0
GST	4,910	0,600	5,930*	0,200	120,7	5,820*	0,200	118,5
GSPx	0,057	0,004	0,046*	0,006	80,7	0,041**	0,002	71,9

Objaśnienia: * p < 0,05; ** p < 0,01

Tab. 3. Koncentracja GSH ($\mu\text{M/g}$ białka) oraz aktywność transferazy glutationowej GST ($\mu\text{M/g}$ białka) i peroksydazy glutationowej GSPx ($\mu\text{M/g}$ białka) w nerce samców myszy pod wpływem testosteronu podawanego przez 3 i 5 dni (kontrola = 100%; n = 10; $\bar{x} \pm SD$)

Badane wskaźniki	Kontrola (olej)		Testosteron 3 dni			Testosteron 5 dni		
GSH	2,390	0,200	1,890*	0,200	79,0	1,910*	0,200	79,9
GST	2,430	0,400	2,850*	0,400	117,3	3,040**	0,300	125,1
GSPx	0,028	0,005	0,023*	0,005	82,0	0,023*	0,003	82,1

Objaśnienia: jak w tab. 2.

Wyniki i omówienie

W doświadczeniu kontrolnym poddano analizie zmiany koncentracji testosteronu we krwi dodatkowych 10 zwierząt pod wpływem iniekcji zastosowanej dawki w ilości 0,05 mg/kg masy ciała. Wyniki zestawiono w tab. 1. Wskazują one, iż zastosowana dawka hormonu zwiększyła u myszy – w porównaniu do grupy kontrolnej – poziom testosteronu do wartości 264%, więc ponad dwukrotnie. Pozwoliło to na sugestię, że egzogenne podany hormon w tej ilości zwiększył koncentrację we krwi tak, iż mógł oddziaływać istotnie na badane wskaźniki w obu badanych organach.

W tab. 2 i 3 podano wyniki dotyczące zmian koncentracji glutationu zredukowanego oraz aktywności obu badanych enzymów w wątrobie i nerce. Przy porównywaniu danych grup kontrolnych (iniekcje oleju) koncentracja GSH oraz aktywność transferazy glutationowej okazały się znacznie, bo ponad dwukrotnie wyższe w wątrobie niż w nerce. Podanie egzogenne-go testosteronu wywołało w wątrobie i nerce samców myszy statystycznie potwierdzone obniżenie koncentracji GSH, natomiast różnokierunkowe zmiany aktywności badanych enzymów glutationowych, a mianowicie podwyższenie aktywności GST i obniżenie aktywności GSPx. Zjawisko to może sugerować zmianę tempa komórkowych procesów metabolicznych w obu badanych gruczołach po otrzymaniu egzogennych nadwyżek tego hormonu.

Obniżenie poziomu GSH można w tych warunkach wyjaśnić wzrostem zapotrzebowania na grupy tiolowe po nadwyżce hormonu anabolicznego, przy niewystarczającym wówczas tempie własnej biosyntezy glutationu. Poziom GSH w komórkach jest zmienny i wynika z funkcji jego syntezy i „obrotu”, za które odpowiedzialne są również badane enzymy glutationowe, a więc peroksydaza i transferaza glutationowe. Niektóre badania wykazały, że hormony płciowe regulują także aktywność enzymów glutationowo-zależnych, biorących udział w obronie komórkowej przed szkodliwym działaniem wolnych rodników (2, 18, 26). Sugerowano poza tym istnienie korelacji pomiędzy koncentracją antyoksydantów a poziomem hormonów (5, 19, 27).

Wzrost aktywności GST po iniekcjach testosteronu może wiązać się z koniecznością zwiększenia tempa biosyntezy glutationu, który – jak wynikało z uzyskanych danych – pod wpływem testosteronu zmniejszał swoją koncentrację. Wydaje się, że wysoka aktywność tego enzymu w wątrobie – ponad dwukrotnie wyższa niż w nerce – może wiązać się z jego udziałem w procesach detoksykacji, prowadzących do powstania S-koniugatów glutationu w wątrobie, transferaza bowiem katalizuje re-

akcje sprzęgania glutationu z dużą liczbą związków farmakologicznie czynnych, co chroni komórki przed potencjalnym zatruciem (33). GST u ssaków bierze udział w śródkomórkowym transporcie różnych endogennych metabolitów, leków i hormonów, co wynika z ich zdolności do wiązania tych rodzajów substancji (24). Wiążą one, między innymi, glikokortykoidy z białkami i tym samym wpływają na transport, metabolizm i działanie steroidów płciowych (24). Transferaza glutationowa może ujawniać właśnie wzrost swej aktywności po wprowadzeniu testosteronu (28). Zespół enzymów GST obecnych w komórkach Leydiga jądra i komórkach Sertoliego znajduje się wg Benbrahim-Tallaa i wsp. (3) pod hormonalną kontrolą FSH, testosteronu i estradiolu.

Iniekcja testosteronu spowodowała obniżenie aktywności peroksydazy glutationowej – enzymu uczestniczącego w tzw. drugiej fazie obrony, gdyż – oprócz redukcji nadtlenu wodoru – redukuje ona również nadtlenuki organiczne przy pomocy zredukowanego glutationu. W związku z tym obserwować można z reguły wysoki niedobór grup SH-glutationu reagujących z wolnymi rodnikami. Azevedo i wsp. (2) nie zaobserwowali znaczących różnic w aktywności GSH-Px w makrofagach samców i samic szczurów. Sądzą oni, że podawanie zastępczo egzogenego testosteronu wykastrowanym samcom szczurów i egzogenego progesteronu samicom szczurów pozbawionym jajników nie wpłynęło znacząco na aktywność peroksydazy glutationowej w ich makrofagach. Według Chai'ny'ego i wsp. (6), podawanie egzogenego testosteronu spowodowało w jądrze szczura obniżenie aktywności GSH-Px i katalazy oraz wiązało się ze znacznym zwiększeniem tempa peroksydacji lipidów.

Piśmiennictwo

- Andersen H., Nielsen J., Nielsen F., Grandjean P.: Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes. *Clin. Chem.* 1997, 43, 562-568.
- Azevedo R. B., Lacava Z. G. M., Miyasaka K. C., Chaves S. B., Curi R.: Regulation of antioxidant enzyme activities in male and female rat macrophages by sex steroids. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2001, 34, 683-687.
- Benbrahim-Tallaa L., Tabone E., Tossier Klopp G., Hately F., Benahmed M.: Glutathione S-transferase alpha expressed in porcine Sertoli cells in under the control of follicle-stimulating hormone and testosterone. *Biol. Reprod.* 2002, 66, 1734-1742.
- Bilińska B., Krzysiek J.: Biosynteza i metabolizm testosteronu oraz jego działanie w gonadzie męskiej. *Endokrynologia Pol.* 1995, 46, 365-378.
- Cardozo-Pelaez F., Brookes P. J., Stedeford T., Song S., Sanchez-Ramos J.: DNA damage, repair and antioxidant systems in brain regions: a correlative study. *Free Radical Biol. Med.* 2000, 28, 779-785.
- Chai'ny G. B., Samantaray S., Samanta L.: Testosterone-induced changes in testicular antioxidant system. *Andrologia* 1997, 29, 343-349.
- Chiu D. T. Y., Stults F. H., Tappel A. L.: Purification and properties of rat lung soluble glutathione peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 1976, 445, 558-566.
- Droge W.: Oxidative stress and aging. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2003, 543, 191-200.
- Ellman G.: Tissue sulphhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 1959, 32, 70-77.
- Ferrando A. A., Sheffield-Moore M., Yeckel C. W., Gilkison C., Jiang J., Achacosa A., Lieberman S. A., Tipton K., Wolfe R. R., Urban R. J.: Testosterone administration to older men improves muscle function: molecular and physiological mechanisms. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2002, 282, E601-607.
- Fox R. M., Jones J. D., Baker J., Pullen R. G. L.: Measurements of glutathione as a marker of oxidative stress in CNS reaggregate cultures. *Biochem. Soc. Trans.* 1996, 24, 452-455.
- Gapstur S. M., Gann P. H., Kopp P., Colangelo L., Longcope C., Liu K.: Serum androgen concentrations in young men: a longitudinal analysis association with age, obesity, and race. The CARDIA male hormone study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prevention* 2002, 11, 1041-1047.
- Griggs R. C., Kingston W., Jozefowicz R. F., Herr B. E., Forbes G., Halliday D.: Effect of testosterone on muscle mass and muscle protein synthesis. *J. Appl. Physiol.* 1989, 66, 450-498.
- Habig W. H., Pabst M. J., Jakoby W. B.: The glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 1974, 249, 7130-7139.
- Hermann M., Berger P.: Hormonal changes in aging men: a therapeutic indication? *Exp. Gerontol.* 2001, 36, 1075-1082.
- Hermann M., Rumpold H., Berger P.: Aging of the male reproductive system. *Exp. Gerontol.* 2000, 35, 1267-1279.
- Howell S., Shalet S.: Testosterone deficiency and replacement. *Hormone Res.* 2001, 56, 86-92.
- Huh K., Shin U. S., Choi J. W., Lee S. I.: Effect of sex hormone on lipid peroxidation in liver. *Arch. Pharm. Res.* 1994, 17, 109-114.
- Inal M., Sunal E., Kanbak G., Zeytinoglu S.: Effects of postmenopausal hormone replacement and alpha-tocopherol on the lipid profiles and antioxidant status. *Clin. Chim. Acta* 1997, 268, 21-29.
- Janssens H., Vanderschueren D. M.: Endocrinological aspects of aging in men: is hormone replacement of benefit? *Europ. J. Obstetrics, Gynecol. Reprod. Biol.* 2000, 92, 7-12.
- Kirschke H., Wiederanders B.: Methoden zur Aktivitätsbestimmung von Proteinases. Martin-Luther Universität, Halle Wittenberg, Wissenschaftliche Beiräte, Halle, Salle 1984, 11-17.
- Kołataj A.: Fizjologiczna rola grup tiolowych. *Kieleskie Studia Biol.* 1986, 3, 127-150.
- Kołataj A.: Pochwała stresu. *Wyd. Nauk. Wyższej Szkoły Pedagogicznej, Kielce* 1993, 5-205.
- Listkowsky I., Abtamovitz M., Homma H., Niitsu Y.: Intracellular binding and transport of hormones and xenobiotics by glutathione-S-transferases. *Drug Metab. Rev.* 1988, 19, 305-318.
- Lowry R. W., Rosebrought G. H., Furr A. L., Randall R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, 193, 265-275.
- Pajović S. B., Saičić Z. S., Spasić M. B., Petrović V. M., Martonović J. V.: Effects of progesterone and estradiol benzoate on glutathione-dependent antioxidant enzyme activities in the brain of female rats. *Gen. Physiol. Biophys.* 1999, 18, 35-44.
- Rapport R., Sklan D., Wolfenson D., Shaham-Albalancy A., Hanukoglu I.: Antioxidant capacity is correlated with steroidogenic status of the corpus luteum during the bovine estrous cycle. *Acta Biochim. Biophys.* 1998, 1380, 133-140.
- Remoue F., Mani J. C., Pugnieri M., Schacht A. M., Capron A., Riveau G.: Functional specific binding of testosterone to schisoma haematobium 28-kilodalton glutathione S-transferase. *Infect. Immun.* 2002, 70, 601-605.
- Schroeder E. T., Terk M., Sattler F. R.: Androgen therapy improves muscle mass and strength but not muscle quality: results from two studies. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2003, 285, E16-E24.
- Sinha-Hikim I., Artaza J., Woodhouse L., Gonzales-Cadavit N., Singh A. B., Lee M. I., Storer T. W., Casburi R., Shen R., Bhasin S.: Testosterone-induced increase in muscle size in healthy young men is associated with muscle fiber hypertrophy. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2002, 283, E154-E160.
- Stocco D. M. N., Clark B. J.: Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. *Endoc. Rev.* 1996, 17, 221-244.
- Tsitouras P. D., Bulat T.: The aging male reproductive system. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 1995, 24, 297-315.
- Walter Z.: Specyficzność tkankowa transferaz S-glutationowych, [w:] Walter Z. (red.): Białka komórek prawidłowych i patologicznych. Łódzkie Towarzystwo Naukowe, Łódź 1994, 154-171.

Adres autora: prof. dr hab. Adam Kołataj, ul. Postępu 1, 05-552 Wólka Kosowska; e-mail: A.Kolataj@ighz.pl