

# Wpływ testosteronu na aktywność enzymów lizosomowych w wątrobie i nerkach myszy utrzymywanych na różnym poziomie białka w paszy

BOŻENA WITEK, EWA OCHWANOWSKA, IWONA STANISŁAWSKA, ARTUR WRÓBEL\*,  
WŁODZIMIERZ MIERZWA\*\*, ADAM KOŁĄTAJ\*\*\*, EMILIA BAGNICKA\*\*\*

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

\*Prywatna Praktyka Stomatologiczna, Kielce

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

\*\*\*Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN, ul. Postępu, 05-552 Wólka Kosowska

Witek B., Ochwanowska E., Stanisławska I., Wróbel A., Mierzwa W., Kołataj A., Bagnicka E.  
**Effect of testosterone on the activity of lysosomal enzymes in the mouse liver and kidney maintained on the different protein level in diet**

## Summary

The experiment was conducted on the influence of testosterone on the activity of ten lysosomal enzymes in the mouse liver and kidney. Mice were divided into two feeding groups [control – 16% protein] and [10% protein] in diet. The animals of the both groups were injected with 0.05 mg/kg b.w. of testosterone intraperitoneally. In the lysosomal fraction of the liver and kidney the activity of lysosomal enzymes were estimated. Testosterone decreased activity of all investigated enzymes in the liver, except alanine aminopeptidase, cathepsins D and L, lysosomal lipase. In the lysosomal fraction of the kidney testosterone decreased of all lysosomal enzymes, too, except alanine aminopeptidase. The results suggest that exogenous testosterone and different proteins diet had a significant influence on the activity of investigated lysosomal enzymes.

**Keywords:** testosterone, protein diet, lysosomal enzymes, mice

W ostatnim dwudziestoleciu przestrzeń lizosomowa komórek ssaków znalazła się w centrum zainteresowań badaczy, między innymi jako potencjalny układ mogący uczestniczyć w reakcjach adaptacyjnych organizmu. Lizosomom poświęconych zostało także wiele naszych wcześniejszych badań (9, 10, 13-15, 20, 25-28).

Białka są jednym z najważniejszych elementów diety niezbędnej do prawidłowego funkcjonowania organizmu zwierząt, co wyraża się bezpośrednim zapotrzebowaniem na aminokwasy endogenne oraz egzogenne. Rodzaj diety białkowej wpływa nie tylko na przebieg podstawowych procesów metabolicznych, ale także na masę ciała, a u zwierząt gospodarskich również na wydajność produktów hodowlanych (1, 5). Jednym z podstawowych obszarów katabolicznych komórki jest przestrzeń lizosomowa, a czynnikami modulującymi jej metabolizm mogą być, m.in. hormony, wśród nich zaś testosteron (20). Oprócz wpływu na proces spermatogenezy oraz rozwój drugo- i trzeciorzędowych męskich cech płciowych, hormon ten uczestniczy w przemianach anabolicznych, a także kształtowaniu się męskiego profilu płciowego – morfologicznego i behawioralnego (16). Podawanie testosteronu wpły-

wa zarówno na syntezę, jak i degradację białek, przyspiesza tempo wzrostu i pokwitania, a u dojrzałych osobników płci męskiej stabilizuje masę mięśniową, dzięki czemu organizm ma zapewnioną odpowiednią retencję azotu, fosforu, potasu i wapnia (4).

Celem badań było określenie aktywności modeliwo wybranych enzymów układu lizosomowego komórek wątroby i nerek myszy pozostających na diecie o zróżnicowanej zawartości białka – standardowej (16%) i wyraźnie obniżonej (10%) oraz poddanych działaniu farmakologicznych dawek egzogennego testosteronu.

## Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 40 samcach myszy linii Swiss, o średniej masie ciała 22,0-23,5 g, wybranych losowo z liczącej ponad 1000 osobników populacji. Zwierzęta pochodziły z hodowli Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu, gdzie utrzymywano je w standardowych warunkach mysiej fermi, w pomieszczeniu o temperaturze 20-22°C i 12-godzinnym cyklu świetlnym, zapewniając im stały dostęp do wody dzięki umocowanym w pokrywie klatek samoczynnym poidełkom. Wszystkie myszy miały zapewnioną fachową opiekę weterynaryjną.

Po odsadzeniu od matek w wieku 6 tygodni myszy zaczęto karmić w okresie następnym 4 tygodni dwoma rodzajami pasz granulowanych, zawierających odpowiednio – 16% białka (grupa kontrolna) i 10% białka (grupa eksperymentalna). Pasza 16% zawierała dokładnie 15,63% białka i 14,04 MJ/kg, pasza o obniżonym poziomie białka zawierała 10,38% białka i 13,47 MJ/kg.

Analizę składu procentowego obu rodzajów pasz opracowano w Instytucie Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego PAN w Jabłonie k./Warszawy, a wyprodukowano je w Instytucie Parazytologii PAN im. Witolda Stefańskiego w Łomnej-Las k./Warszawy, specjalnie dla potrzeb tego eksperymentu.

Po 21 dniach podawania obu rodzajów pasz, 9-tygodniowe myszy podzielono w obrębie tych grup żywieniowych na liczące po 10 osobników grupy doświadczalne (tab. 1).

Myszom grup kontrolnych (I, III) podawano codziennie w iniekcji dootrzewnowej olej w objętości 200  $\mu$ l/mysz, raz dziennie stale o godzinie 8:00 w okresie 5 dni. Myszy grup doświadczalnych (II, IV) w iniekcji dootrzewnowej otrzymywały testosteron w dawce 0,05 mg/kg masy ciała, w objętości 200  $\mu$ l/mysz, raz dziennie o godzinie 8:00, w okresie 5 dni. Dawkę testosteronu dobrano tak, aby stężenie testosteronu w osoczu krwi myszy doświadczalnych było ponad dwukrotnie wyższe niż u osobników kontrolnych. Wszystkie te dane zestawiono w tab. 1.

Po upływie 12 godzin od ostatniej iniekcji myszy wszystkich grup dekapitowano, po czym natychmiast pobierano fragmenty wątroby i nerek. Przygotowanie homogenatów wątroby i nerek przeprowadzono zgodnie z metodą Beaufay'a (3). Wypreparowane wątroby ważono, perfundowano schłodzonym do 4°C roztworem 0,9% chlorku sodu celem usunięcia elementów morfotycznych krwi i podobnie jak zważone nerki zawieszano w schłodzonym do 5°C 100 mM buforze fosforanowym o pH 7,0, w stosunku 500 mg tkanki/5 ml buforu. Tak przygotowaną całość homogenizowano w niskoobrotowym homogenizatorze Pottera-Elvehjema z tłokiem teflonowym, umieszczonym w pojemniku z pokruszonym lodem, przy 200 obrotach/minutę, przeprowadzając cztery cykle tłoka „góra-dół”.

Otrzymane homogenaty wątroby i nerek wirowano w wirówce Janetzky'ego K-26D przez 8 minut przy 600 g. Uzyskane nadsącze poddawano ponownemu wirowaniu przez 20 minut przy 20 000 g (wirówka K-26D). Osady otrzymane z wirowania rozpuszczano w 4 ml 0,1% Tritonu X-100, czterokrotnie zamrażano i rozmrażano, po czym przechowywano w temperaturze –20°C. Tak przygotowane nadsącze przed przystąpieniem do analiz wirowano ponownie w wirówce K-26D przez 5 minut przy 700 g. Otrzymane supernatanty poddawano weryfika-

Tab. 1. Grupy doświadczalne myszy

Pasza o 16 % zawartości białka		Pasza o 10 % zawartości białka	
I.	zwierzęta kontrolne otrzymujące olej ( <i>oleum pro iniectione</i> ; Polfa, Warszawa)	III.	zwierzęta kontrolne otrzymujące olej ( <i>oleum pro iniectione</i> ; Polfa, Warszawa)
II.	zwierzęta doświadczalne otrzymujące testosteron (Testosteronum propionicum; Jelfa Przedsiębiorstwo Farmaceutyczne S.A. Jelenia Góra)	IV.	zwierzęta doświadczalne otrzymujące testosteron (Testosteronum propionicum; Jelfa Przedsiębiorstwo Farmaceutyczne S.A. Jelenia Góra)

cji na aktywność fosfatazy kwasnej (AcP) – EC 3.1.3.2 (8) uznawanej za enzym znacznikowy służący do identyfikacji frakcji lizosomowej. Po jej pozytywnej lokalizacji w przygotowanych supernatantach oznaczano aktywność badanych hydrolaz lizosomowych zgodnie z danymi zawartymi w tab. 2.

Aktywność badanych enzymów lizosomowych oznaczano, stosując syntetyczne **substraty 4-nitrofenylowe**, odpowiednio dla: fosfatazy kwasnej (4-nitrophenyl phosphate, disodium salt hexahydrate),  $\beta$ -N-acetylo-hexozaminidazy (4-nitrophenyl-N-acetyl- $\beta$ -D-hexosaminide),  $\beta$ -glukozydazy (4-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside),  $\beta$ -galaktozydazy (4-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside),  $\beta$ -glukuronidazy (4-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucuronide) oraz dla esterazy lizosomowej (4-nitrophenyl palmitate); **substraty  $\beta$ -naftyloamidowe** dla: aminopeptydazy alaninowej (L-Alanine  $\beta$ -Naphthylamide) i aminopeptydazy leucynowej (L-Leucine  $\beta$ -Naphthylamide hydrochloride); **syntetyczną azokazeinę** jako substrat dla katepsyn D i L (2% Azo-casein sodium salt w 6 M moczniku) oraz **dwumaślan fenoloftaleiny** jako substrat dla lipazy lizosomowej (phenolphthalein dibutyrate). Oznaczenie aktywności wykonano zgodnie z danymi opisanymi poniżej:

**Wykonanie oznaczeń dla AcP, Hex,  $\beta$ -Glu,  $\beta$ -Gal,  $\beta$ -GlcUr, EL i LL:**

- 100  $\mu$ l badanej próby,
- 1000  $\mu$ l odpowiedniego substratu,
- 1 godzina inkubacji w temperaturze 37°C,
- 1000  $\mu$ l buforu alkalicznego – po 60 minutach inkubacji,
- pomiar ekstynkcji przy długości fali 420 nm (dla LL przy 530 nm).

Tab. 2. Wykaz badanych hydrolaz lizosomowych

Nazwa enzymu	Stosowany skrót i numer enzymu	Metoda
Fosfataza kwasna	AcP (EC 3.1.3.2)	Hollander, 1970 (8)
$\beta$ -N-acetylo-hexozaminidaza	Hex (EC 3.2.1.52)	Barrett, 1972 (2)
$\beta$ -glukozydaza	$\beta$ -Glu (EC 3.2.1.21)	Barrett, 1972 (2)
$\beta$ -galaktozydaza	$\beta$ -Gal (EC 3.2.1.23)	Barrett, 1972 (2)
$\beta$ -glukuronidaza	$\beta$ -GlcUr (EC 3.2.1.31)	Barrett, 1972 (2)
Aminopeptydaza leucynowa	LeuAP (EC 3.4.11.1)	Pfleiderer i Celliers, 1963 (21)
Aminopeptydaza alaninowa	AlaAP (EC 3.4.11.2)	Pfleiderer i wsp., 1964 (22)
Katepsyny D i L	Cath. D (EC 3.4.23.5) Cath. L (EC 3.4.22.15)	Langner i wsp., 1973 (17) Langner i wsp., 1973 (17)
Lipaza lizosomowa	LL (EC 3.1.1.13)	Main, 1960 (18)
Esteraza lizosomowa	EL (EC 3.1.1.2)	Main, 1960 (18)
Białko ogólne		Kirschke i Wiederanders, 1984 (12)

**Wykonanie oznaczeń dla AlaAP i LeuAP:**

- 100 µl badanej próby,
- 1000 µl odpowiedniego substratu,
- 1 godzina inkubacji w temperaturze 37°C,
- 1000 µl odczynnika sprzęgającego – po 60 minutach inkubacji,

- pomiar ekstynkcji przy długości fali 540 nm.

**Wykonanie oznaczenia dla Cath. D i L:**

- 100 µl badanej próby,
- 50 µl buforu octanowego (100 mM, pH 5,0),
- 250 µl roztworu azokazeiny,
- 1 godzina inkubacji w temperaturze 37°C,
- 200 µl 10% TCA – po 60 minutach inkubacji,
- wymieszanie, odwirowanie,
- pomiar ekstynkcji przy długości fali 366 nm.

Pomiarów ekstynkcji dokonywano spektrofotometrem Lambda Bio firmy Perkin-Elmer (USA). Aktywność badanych hydrolaz lizosomowych wyrażono w nmolach (odpowiedniego) substratu/mg białka/godzinę.

W uzyskanych supernatantach lizosomowych oznaczono również poziom białka całkowitego (12).

Wszystkie zastosowane w doświadczeniu substraty pochodziły z firmy Serva Feinbiochemica GmbH&Co., Heidelberg, Germany.

Statystyczne określenie istotności wpływu zastosowanych w doświadczeniu czynników doświadczalnych (rodzaj diety białkowej, iniekcja oleju, iniekcja testosteronu oraz interakcje między tymi czynnikami) na aktywność badanych enzymów wykonano, stosując analizę wariancji wieloczynnikowej przy pomocy procedury GLM, pakietu z testem Duncana (SAS/STAT 1999-2001, User's Guide, SAS Institute Inc. Cary, USA), stosując następujący model:

$$y_{ijk} = P_i + C_j + P_i * C_j + e_{ijk}$$

gdzie:

$y_{ijk}$  – aktywność badanych enzymów w wątrobie lub w nerce,

$P_i$  – stały wpływ poziomu żywienia ( $i = 1,2$ ),

$C_j$  – stały wpływ iniekcji oleju lub testosteronu ( $j = 1,2$ ),

$P_i * C_j$  – stały wpływ interakcji poziomu żywienia i iniekcji ( $i, j = 1,2,3,4$ ),

$e_{ijk}$  – błąd.

Eksperyment został zatwierdzony przez Komisję Etyczną do Badań nad Zwierzętami działającą przy Instytucie Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu (Nr 18/99).

**Wyniki i omówienie**

Uzyskane wyniki odnoszą się do zmian aktywności enzymów lizosomowych w badanych organach (wątroba, nerki) wywołanych działaniem czynników doświadczalnych w postaci iniekcji testosteronu oraz zróżnicowanych poziomów żywienia białkowego (16% i 10% białka w paszy).

Tab. 3 przedstawia zmiany koncentracji testosteronu w osoczu krwi myszy kontrolnych po iniekcjach tego hormonu (grupa doświadczalna). Stężenie testosteronu w osoczu krwi myszy kontrolnych żywionych paszą o 16% zawartości białka i poddanych dootrzewnowej iniekcji oleju wynosiło 60,6 ng/dL. Po dootrzewnowych iniekcjach testosteronu w dziennej dawce

**Tab. 3. Koncentracja testosteronu (ng/dL) w osoczu krwi badanych myszy grup kontrolnych (I, III) i doświadczalnych (II, IV)**

Grupy myszy	Testosteron $\bar{x} \pm se$	Procentowe zmiany wobec kontroli
Dieta -16% białka		
Oleum pro iniectione – 200 µl (kontrola)	60,6 ± 12,1	164
Testosteron – 0,05 mg/kg m.c.	160,0 ± 25,3*	
Dieta – 10% białka		
Oleum pro iniectione – 200 µl (kontrola)	72,5 ± 14,1	130
Testosteron – 0,05 mg/kg m.c.	167,0 ± 30,4*	

Objaśnienia: \* – różnice potwierdzone statystycznie przy  $p \leq 0,001$

0,05 mg testosteronu/kg masy ciała stężenie testosteronu zwiększyło się do 160,0 ng/dL ( $p \leq 0,05$ ), co oznacza wzrost stężenia testosteronu o 164% wobec wartości jego stężenia w grupie myszy kontrolnych.

W grupie myszy żywionych dietą o 10% poziomie białka, stwierdzono wzrost koncentracji testosteronu z 72,5 ng/dL w grupie myszy kontrolnych do 167,0 ng/dL ( $p \leq 0,05$ ) w grupie myszy doświadczalnych. Oznacza to, że po iniekcjach testosteronu jego stężenie w grupie osobników doświadczalnych zwiększyło się o 130%, wobec wartości stężenia testosteronu w grupie kontrolnej. Dane te wskazują, że koncentracja testosteronu po wstępnych jego iniekcjach eksperymentalnych ponad dwukrotnie przewyższała wartość w surowicy zwierząt kontrolnych (160,0 wobec 60,6 ng/dL i 167,0 wobec 72,5 ng/dL), a więc testosteron mógł istotnie oddziaływać na reaktywność badanych enzymów lizosomowych w wątrobie i w nerkach.

Z tab. 4 wynika, że po podaniu testosteronu w wątrobie myszy żywionych paszą zawierającą 16% białka nastąpiło istotne zwiększenie aktywności  $\beta$ -glukuronidazy o 51% ( $p \leq 0,01$ ), katepsyn D i L o 133% ( $p \leq 0,01$ ), esterazy lizosomowej o 37% ( $p \leq 0,01$ ) oraz lipazy lizosomowej o 133% ( $p \leq 0,01$ ) w porównaniu z wartościami w grupie kontrolnej. Jednocześnie iniekcja testosteronu wywołała zmniejszenie aktywności  $\beta$ -N-acetylo-hexozaminidazy o 44% ( $p \leq 0,01$ ),  $\beta$ -glukozydazy o 24% ( $p \leq 0,01$ ),  $\beta$ -galaktozydazy o 43% ( $p \leq 0,01$ ), aminopeptydazy alaninowej o 48% ( $p \leq 0,01$ ) oraz aminopeptydazy leucynowej o 52% ( $p \leq 0,01$ ). Nie wykazano istotnych zmian aktywności fosfatazy kwaśnej.

Jak wynika z tab. 5, w wątrobie myszy żywionych paszą o 10% zawartości białka, po podaniu testosteronu stwierdzono znamienne zwiększenie aktywności aminopeptydazy leucynowej o 70% ( $p \leq 0,01$ ) i lipazy lizosomowej o 75% ( $p \leq 0,01$ ) oraz zmniejszenie aktywności fosfatazy kwaśnej o 35% ( $p \leq 0,01$ ),  $\beta$ -N-acetylo-hexozaminidazy o 36% ( $p \leq 0,01$ ),  $\beta$ -glukozydazy o 49% ( $p \leq 0,01$ ),  $\beta$ -galaktozydazy o 55% ( $p \leq 0,01$ ),  $\beta$ -glukuronidazy o 54% ( $p \leq 0,01$ ), aminopeptydazy alaninowej o 79% ( $p \leq 0,01$ ), katepsyn

Tab. 4. Aktywność enzymów lizosomowych w wątrobie myszy żywionych paszą o 16% zawartości białka (nmol/mg białka/godz.) po 5 dobach podawania testosteronu; kontrola (olej) = 100%; (Lsmean – średnia najmniejszych kwadratów, se – błąd standardowy szacunku)

Enzym	Kontrola		% zmian	Testosteron		Procentowa wartość zmian (5:2)	Zmiany wobec kontroli (4:7 lub 7:4)
	Lsmean	se		Lsmean	se		
1	2	3	4	5	6	7	8
Fosfataza kwaśna	9,06	0,51	100	8,22 <sup>NS</sup>	0,51	91	-9
$\beta$ -N-acetylo-hexozaminidaza	2,34	0,14	100	1,32 <sup>**</sup>	0,14	56	-44
$\beta$ -glukozydaza	0,58	0,03	100	0,44 <sup>**</sup>	0,03	76	-24
$\beta$ -galaktozydaza	0,72	0,03	100	0,41 <sup>**</sup>	0,03	57	-43
$\beta$ -glukuronidaza	0,71	0,04	100	1,07 <sup>**</sup>	0,04	151	+51
Aminopeptydaza alaninowa	5,53	0,24	100	2,86 <sup>**</sup>	0,24	52	-48
Aminopeptydaza leucynowa	6,66	0,17	100	3,18 <sup>**</sup>	0,17	48	-52
Katepsyny D i L	0,06	0,10	100	0,14 <sup>**</sup>	0,10	233	+133
Esteraza lizosomowa	2,24	0,12	100	3,08 <sup>**</sup>	0,12	137	+37
Lipaza lizosomowa	2,72	0,32	100	6,33 <sup>**</sup>	0,32	233	+133

Objaśnienia: \*\* – różnice potwierdzone statystycznie przy  $p \leq 0,01$ ; NS – brak istotności różnic

Tab. 5. Aktywność enzymów lizosomowych w wątrobie myszy żywionych paszą o 10% zawartości białka (nmol/mg białka/godz.) po 5 dobach podawania testosteronu; kontrola (olej) = 100%; (Lsmean – średnia najmniejszych kwadratów, se – błąd standardowy szacunku)

Enzym	Kontrola		% zmian	Testosteron		% zmian	Procentowe zmiany wobec kontroli
	Lsmean	se		Lsmean	se		
Fosfataza kwaśna	8,63	0,51	100	5,60 <sup>**</sup>	0,51	65	-35
$\beta$ -N-acetylo-hexozaminidaza	1,27	0,14	100	0,81 <sup>**</sup>	0,14	64	-36
$\beta$ -glukozydaza	0,37	0,03	100	0,19 <sup>**</sup>	0,03	51	-49
$\beta$ -galaktozydaza	0,44	0,03	100	0,20 <sup>**</sup>	0,03	45	-55
$\beta$ -glukuronidaza	0,69	0,04	100	0,32 <sup>**</sup>	0,04	46	-54
Aminopeptydaza alaninowa	9,81	0,24	100	2,09 <sup>**</sup>	0,24	21	-21
Aminopeptydaza leucynowa	1,50	0,17	100	2,55 <sup>**</sup>	0,17	170	+70
Katepsyny D i L	0,12	0,10	100	0,06 <sup>**</sup>	0,10	50	-50
Esteraza lizosomowa	1,78	0,12	100	1,13 <sup>**</sup>	0,12	63	-37
Lipaza lizosomowa	3,60	0,32	100	6,32 <sup>**</sup>	0,32	175	+75

Objaśnienia: \*\* – różnice potwierdzone statystycznie przy  $p \leq 0,01$

D i L o 50% ( $p \leq 0,01$ ) oraz esterazy lizosomowej o 37% ( $p \leq 0,01$ ) w stosunku do wartości aktywności w grupie kontrolnej. Wzrost aktywności aminopeptydazy leucynowej i lipazy lizosomowej w wątrobie myszy żywionych paszą o niedostatecznej zawartości białka i po podaniu testosteronu świadczyć może o stymulowaniu procesu syntezy tych enzymów w warunkach niedoboru białka w diecie i zmianie tempa metabolizmu w komórkach wątroby wywołanego nadmiarem egzogenego testosteronu.

w przeważającej liczbie odnotowano obniżenie aktywności badanych hydrolaz. W nerkach myszy pozostających na diecie standardowej (16% białka) liczba istotnych statystycznie zmian w kierunku zwiększenia lub zmniejszenia aktywności była porównywalna, zaś w nerkach myszy żywionych dietą niskobiałkową (10%) istotny wzrost aktywności wykazano w pięciu wypadkach, a jej obniżenie jedynie w dwóch.

Analiza zmian aktywności badanych enzymów w wątrobie myszy grup kontrolnych (I, III) żywionych

Po iniekcji testosteronu wykazano w nerkach myszy żywionych paszą o 16% poziomie białka (tab. 6), znaczne podwyższenie aktywności  $\beta$ -glukuronidazy (o 190%;  $p \leq 0,01$ ), aminopeptydazy alaninowej (o 52%;  $p \leq 0,01$ ) i esterazy lizosomowej (o 43%;  $p \leq 0,01$ ) oraz istotne zmniejszenie aktywności fosfatazy kwaśnej (o 57%;  $p \leq 0,01$ ),  $\beta$ -N-acetylo-hexozaminidazy (o 62%;  $p \leq 0,01$ ),  $\beta$ -glukozydazy (o 20%;  $p \leq 0,05$ ) w porównaniu z aktywnościami w grupie kontrolnej. Nie stwierdzono istotnych zmian aktywności  $\beta$ -galaktozydazy, aminopeptydazy leucynowej, katepsyn D i L oraz lipazy lizosomowej.

W nerkach myszy żywionych paszą o 10% zawartości białka po iniekcji testosteronu (tab. 7) stwierdzono znaczne zwiększenie aktywności fosfatazy kwaśnej o 64% ( $p \leq 0,01$ ),  $\beta$ -galaktozydazy o 89% ( $p \leq 0,01$ ), aminopeptydazy alaninowej o 37% ( $p \leq 0,01$ ), aminopeptydazy leucynowej o 71% ( $p \leq 0,01$ ) i katepsyn D i L o 28% ( $p \leq 0,05$ ) oraz obniżenie aktywności  $\beta$ -glukozydazy o 20% ( $p \leq 0,05$ ) i  $\beta$ -glukuronidazy o 32% ( $p \leq 0,05$ ). Nie stwierdzono istotnych zmian aktywności  $\beta$ -N-acetylo-hexozaminidazy, esterazy lizosomowej i lipazy lizosomowej.

Analiza wyników zestawionych w tabelach 4-7 dowodzi, że w wątrobie myszy pozostających na obu rodzajach paszy (16% i 10%), po iniekcji testosteronu

paszami o 16% i 10% zawartości białka pozwala zauważyć, że w wątrobie myszy utrzymywanych na paszy 10% (tab. 5) w porównaniu z myszami żywionymi paszą 16% (tab. 4) stwierdzono istotne zwiększenie aktywności aminopeptydazy alaninowej (z 5,53 do 9,81,  $p \leq 0,01$ ), katepsyn D i L (z 0,06 do 0,12,  $p \leq 0,01$ ) i lipazy lizosomowej (z 2,72 do 3,60,  $p \leq 0,01$ ), ale też znamienne zmniejszenie aktywności  $\beta$ -N-acetylo-hexozaminidazy (z 2,34 do 1,27,  $p \leq 0,01$ ),  $\beta$ -glukozydazy (z 0,58 do 0,37,  $p \leq 0,01$ ),  $\beta$ -galaktozydazy (z 0,72 do 0,44,  $p \leq 0,01$ ), aminopeptydazy leucynowej (z 6,66 do 1,50,  $p \leq 0,01$ ) i esterazy lizosomowej (z 2,24 do 1,78,  $p \leq 0,05$ ). Nie wykazano istotnych zmian aktywności fosfatazy kwasnej i  $\beta$ -glukuronidazy.

W nerkach myszy pozostających na paszy zawierającej 10% białka (tab. 7) wykazano istotne podwyższenie aktywności jedynie aminopeptydazy alaninowej (z 34,87 do 46,29,  $p \leq 0,01$ ), ale obniżenie aktywności fosfatazy kwasnej (z 49,79 do 16,84,  $p \leq 0,01$ ),  $\beta$ -N-acetylo-hexozaminidazy (z 12,09 do 6,45,  $p \leq 0,01$ ),  $\beta$ -galaktozydazy (z 2,33 do 1,04,  $p \leq 0,01$ ) wobec wartości aktywności tych enzymów w grupie myszy utrzymywanych na paszy zawierającej 16% białka (tab. 6). Nie stwierdzono istotnych zmian aktywności  $\beta$ -glukozydazy,  $\beta$ -glukuronidazy, aminopeptydazy leucynowej, katepsyn D i L, esterazy lizosomowej i lipazy lizosomowej.

Białka odgrywają zasadniczą rolę w metabolizmie oraz w procesach wzrostu i rozwoju organizmu (7). Pewna, choć bardzo niewielka pula białek przyjętych w nadmiarze wraz pożywieniem, magazynowana jest w wątrobie i mięśniach, jednak główna ich część poddawana jest degradacji na szlaku proteolizy realizowanej w lizosomach (23). Zmiany aktywności enzymów lizosomowych poza charakterem adaptacyjnym pozostają w związku ze zmianą intensywności przemian metabolicznych, które zabezpieczają prawidłową strukturę i funkcje komórki w stanach niedoboru białkowego

**Tab. 6. Aktywność enzymów lizosomowych w nerkach myszy żywionych paszą o 16% zawartości białka (nmol/mg białka/godz.) po 5 dobach podawania testosteronu; kontrola (olej) = 100%; (Lsmean – średnia najmniejszych kwadratów, se – błąd standardowy szacunku)**

Enzym	Kontrola			Testosteron			Procentowe zmiany wobec kontroli
	Lsmean	se	% zmian	Lsmean	se	% zmian	
Fosfataza kwasna	49,79	2,71	100	21,29**	2,71	43	-57
$\beta$ -N-acetylo-hexozaminidaza	12,09	0,82	100	4,57**	0,82	38	-62
$\beta$ -glukozydaza	0,15	0,01	100	0,12*	0,01	80	-20
$\beta$ -galaktozydaza	2,33	0,17	100	1,98 <sup>NS</sup>	0,17	85	-15
$\beta$ -glukuronidaza	0,49	0,06	100	1,42**	0,06	290	+190
Aminopeptydaza alaninowa	34,87	2,76	100	53,03**	2,76	152	+52
Aminopeptydaza leucynowa	25,61	2,09	100	22,80 <sup>NS</sup>	2,09	89	-11
Katepsyny D i L	0,07	0,01	100	0,06 <sup>NS</sup>	0,01	86	-14
Esteraza lizosomowa	1,12	0,09	100	1,60**	0,09	143	+43
Lipaza lizosomowa	0,29	0,02	100	0,24 <sup>NS</sup>	0,02	83	-17

Objaśnienia: \* i \*\* – różnice potwierdzone statystycznie przy  $p \leq 0,05$  i  $p \leq 0,01$ ; NS – brak istotności różnic

**Tab. 7. Aktywność enzymów lizosomowych w nerkach myszy żywionych paszą o 10% zawartości białka (nmol/mg białka/godz.) po 5 dobach podawania testosteronu; kontrola (olej) = 100%; (Lsmean – średnia najmniejszych kwadratów, se – błąd standardowy szacunku)**

Enzym	Kontrola			Testosteron			Procentowe zmiany wobec kontroli
	Lsmean	se	% zmian	Lsmean	se	% zmian	
Fosfataza kwasna	16,84	2,71	100	27,64**	2,71	164	+64
$\beta$ -N-acetylo-hexozaminidaza	6,45	0,82	100	6,66 <sup>NS</sup>	0,82	103	+3
$\beta$ -glukozydaza	0,15	0,01	100	0,12*	0,01	80	-20
$\beta$ -galaktozydaza	1,04	0,17	100	1,97**	0,17	189	+89
$\beta$ -glukuronidaza	0,54	0,06	100	0,37*	0,06	68	-32
Aminopeptydaza alaninowa	46,29	2,76	100	63,42**	2,76	137	+37
Aminopeptydaza leucynowa	21,87	2,09	100	37,33**	2,09	171	+71
Katepsyny D i L	0,07	0,01	100	0,09*	0,01	128	+28
Esteraza lizosomowa	1,13	0,09	100	1,03 <sup>NS</sup>	0,09	91	-9
Lipaza lizosomowa	0,25	0,02	100	0,28 <sup>NS</sup>	0,02	112	+12

Objaśnienia: jak w tab. 6.

(11). Badania (6, 19, 24) wskazują, że w wyniku zmiany diety standardowej na niskobiałkową dochodzi do wzrostu we krwi poziomu trijodotyroniny, tyroksyny, hormonu wzrostu i insulinopodobnego czynnika IGF-1, których podwyższony poziom prowadzi do zwiększenia intensywności transportu aminokwasów do mięśni, nasilając jednocześnie intensywność toczących się tam procesów proteolitycznych. Wzrost aktywności aminopeptydazy leucynowej i katepsyn D i L w wątrobie i nerkach myszy żywionych paszą

niskobiałkową, gdzie alanina, leucyna i glutamina odpowiadają za uwolnienie prawie 50% całkowitego azotu, może świadczyć o naturalnej odpowiedzi przystosowawczej komórek tych organów. Jest możliwe, że podczas zagrożenia niską podażą białka lizosomy hepatocytów i komórek nerek, poprzez zmiany aktywności swoich enzymów zabezpieczają tym komórkom możliwość dłuższego przetrwania. Wyniki naszych badań są potwierdzeniem wyników uzyskanych wcześniej (9, 10) i wskazują, że diety niestandardowe zarówno niskobiałkowe, ale także wysokobiałkowe mogą generować istotne zmiany aktywności wszystkich grup enzymów lizosomowych nie tylko w wątrobie, lecz również w nerkach.

Iniekcja egzogenego testosteronu w dawce 0,05 mg/kg m.c. u myszy żywionych paszą o 10% zawartości białka wywołała ponad dwukrotne zwiększenie koncentracji tego hormonu w osoczu krwi, w porównaniu z jego wartościami w grupie osobników pozostających na diecie standardowej. Wielokrotne iniekcje testosteronu w wątrobie badanych myszy (pasza 16% i 10%) w przeważającej liczbie wykazywały obniżenie aktywności badanych hydrolaz. W nerkach myszy pozostających na paszy o 16% zawartości białka liczba istotnych zmian aktywności była porównywalna, zaś w nerkach myszy żywionych paszą 10% przeważały zmiany w kierunku wzrostów aktywności badanych enzymów.

Reasumując, uzyskane przez nas wyniki wskazują, że wprowadzony egzogenicznie testosteron oraz niestandardowa dieta o obniżonej zawartości białka (10%) w istotny sposób oddziaływały na aktywność badanych hydrolaz komórek wątroby i nerek. Na tej podstawie można sugerować, że zakłócenia homeostazy biochemicznej – testosteronem czy też niedostatecznym udziałem białka w diecie, zmieniały aktywność enzymów lizosomowych. Różny stopień reaktywności tych enzymów w odpowiedzi na egzogeniczny testosteron zależał od badanego organu, rodzaju paszy i enzymu.

### Piśmiennictwo

1. Alleman F., Michel J., Chagneau A. M., Leclercq B.: The effect of dietary protein independent of essential amino acid of growth and body composition in genetically lean and fat chickens. *Br. Poultry Sci.* 2000, 41, 214-218.
2. Barrett A. J.: Lysosomal enzymes, [w:] *Lysosomes. A Laboratory Handbook* (Dingle J. T.), North-Holland Publ. Co., Amsterdam 1972, 46-135.
3. Beaufay H.: Methods for isolation of lysosomes, [w:] *Lysosomes. A Laboratory Handbook*. (Dingle J. T.), North-Holland Publ. Co., Amsterdam 1972, 1-30.
4. Bhasin S., Storer T. W., Berman N.: Testosterone replacement increases fat mass and muscle protein synthesis in hypogonadal men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1997, 81, 3469-3475.
5. Corwin R. L.: Biological and behavioral consequences of food restriction. *Appetite* 2000, 34, 112-113.
6. Gonzales E., Buysse J., Loddi M. M., Takita T. S., Buys N., Decuyper E.: Performance, incident of metabolic disturbance and endocrine variables of food – restricted male broiler chickens. *Br. Poultry Sci.* 1998, 39, 671-678.
7. Grizard J., Dardevet D., Papet I., Mosoni L., Patureau Mirand P., Attaix D.: Nutrient regulation of skeletal muscle protein metabolism in animals. *Nutr. Res. Rev.* 1995, 53, 132-156.
8. Hollander V. P.: Acid phosphatases, [w:] *The Enzymes* (Boyer P. D.), Academic Press, London 1970, 449-498.
9. Józwiak A.: Wpływ różnicowanego żywienia białkowego na aktywność enzymów lizosomowych w wątrobie, nerce i mięśniu szkieletowym myszy

- selekcjonowanych na wysokie tempo przyrostu masy ciała. Praca doktorska, Instytut genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu, Biblioteka Instytutu, 2001, 1-102.
10. Józwiak A., Śliwa-Józwiak A., Kumański K., Kołtąj A.: The Activity of Lysosomal Enzymes in the Liver, Kidney and the Skeletal Muscle of Mice Remaining on Low Protein Diet. *Acta Biol. Cracov. Series. Zool.* 2005, 47, 67-72.
  11. Kilicalp D., Dede S., Belge F., Tatar M.: Effect of protein deficiency on macroelement and trace element levels of weanling rats' small intestine and liver tissues. *Biol. Trace Elem. Res.* 2005, 107, 255-261.
  12. Kirschke H., Wiederanders B.: Methoden zur Aktivitätsbestimmung von Proteinase. Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg, Wissenschaftl. Beitr. Halle/Salle 1984, 11-17.
  13. Kołtąj A., Dymnicki E., Oprządek J., Józwiak A., Śliwa-Józwiak A., Oprządek A.: Influence of starvation and sex on some lysosomal enzymes activity in young dairy cattle. *Arch. Tierzucht* 2004, 3, 225-230.
  14. Kołtąj A., Konecka A. M., Śliwa-Józwiak A., Józwiak A.: Effect of antioxidants on lysosomal enzyme activity in mouse liver, kidney and muscle. I. Effect of vitamin C. *Acta Biol. Cracov. Series Zool.* 2003 45, 49-53.
  15. Kołtąj A., Witek B., Ochwanowska E., Baranowska D., Kmera-Muszyńska M.: Wpływ witamin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub> na aktywność enzymów lizosomowych w wątrobie i nerce myszy doświadczalnych. *Medycyna Wet.* 2006, 62, 347-351.
  16. Kubini K., Zachmann M., Albers N., Hiort O., Bettendorf M., Wölfl J., Bidlingmaier R., Klingmüller D.: Basal Inhibin B and the Testosterone Response to Human Chorionic Gonadotropin Correlate in Prepubertal Boys. *J. Clin. Endocrinol. Met.* 2000, 85, 134-138.
  17. Langner J., Wakil A., Zimmermann M., Ansorge S., Bohley P., Kirschke H., Wiederanders B.: Aktivitätsbestimmung proteolytischer Enzyme mit Azokasein als Substrat. *Acta Biol. Med. Germ.* 1973, 31, 1-18.
  18. Main A. R.: The purification of the enzyme hydrolyzing diethyl p-nitrophenyl phosphate (paraoxon) in sheep serum. *J. Biol. Chem.* 1960, 74, 11-20.
  19. Mc Murtry J. P.: Nutritional amid developmental role of insulin-like growth factor in poultry. *J. Nutr.* 1998, 128, 302S-305S.
  20. Ochwanowska E.: Wpływ insuliny i glukagonu na aktywność wybranych enzymów lizosomowych w wątrobie i nerce myszy utrzymywanych na różnym poziomie żywienia białkowego. Praca doktorska. Biblioteka Akademii Pedagogicznej w Krakowie 2004, 5-62.
  21. Pfeleiderer G., Celliers P. G.: Isolierung der Aminopeptidase aus Nierenpartikeln. *Biochem. Zeitschr.* 1963, 339, 186-189.
  22. Pfeleiderer G., Celliers P. G., Stanulovic M., Wachsmuth E. D., Braunitzer G.: Eigenschaften und analytische Anwendungen der Aminopeptidase aus Nierenpartikeln. *Biochem. Zeitschr.* 1964, 340, 417-429.
  23. Pillay C. S., Elliot E., Dennison C.: Endolysosomal proteolysis and its regulation. *Biochem. J.* 2002, 363, 417-429.
  24. Rosenbrought R. W.: Dietary protein levels and the responses of broilers to single or repeated bouts of fasting and refeeding. *Nutr. Res.* 2000, 20, 877-887.
  25. Stojek W., Borman A., Glac W., Baracz-Józwiak B., Witek B., Kamyczek M., Tokarski J.: Stress-induced enhancement of activity of lymphocyte lysosomal enzymes in pigs of different stress-susceptibility. *J. Physiol. Pharm.* 2006, 57, supp. 8, 61-72.
  26. Śliwa-Józwiak A., Józwiak A., Kołtąj A.: Influence of exogenous glutathione (GSH), as stress factor, on the activity of lysosome enzymes in some organs of mice. *Arch. Tierzucht, Dummerstorf* 2002, 45, 3, 307-314.
  27. Witek B., Graniczka A., Ochwanowska E., Kołtąj A.: Aktywność enzymów lizosomowych w wątrobie i nerkach myszy po iniekcjach glukagonu. *Medycyna Wet.* 2006, 62, 717-719.
  28. Witek B., Ochwanowska E., Rafay J., Kołtąj A., Chrenek P., Suvegova K., Jurcik R., Sirotkin A., Darlak K.: Effect of ghrelin on activities of some lysosomal hydrolases in rabbits. *Neuroendocrinology Letters* 2005, 26, 4, 397-400.

Adres autora: dr hab. Bożena Witek, ul. Świętokrzyska 15, 25-406 Kielce;  
e-mail: b.witek@pu.kielce.pl