

# **Valutazione sperimentale dell'effetto di sostanze biologiche su alcuni parametri biochimici correlati al metabolismo energetico muscolare**

## **1. Azione del testosterone propionato**

**Ornella Pastoris, Maurizia Dossena,  
Donatella Fulle, Marco Taglietti,  
Gianni Benzi**

### **O. Pastoris**

Istituto di Farmacologia  
Facoltà di Scienze MM.FF.NN.  
Università di Pavia

### **M. Dossena**

Istituto di Farmacologia  
Facoltà di Scienze MM.FF.NN.  
Università di Pavia

### **D. Fulle**

Istituto di Farmacologia  
Facoltà di Scienze MM.FF.NN.  
Università di Pavia

### **M. Taglietti**

Istituto di Farmacologia  
Facoltà di Scienze MM.FF.NN.  
Università di Pavia

### **G. Benzi**

Direttore Fiduciario del  
C.S. & R. F.I.D.A.L.

### **Introduzione**

La regolazione dell'« effettore » muscolare avviene sia tramite via nervosa che tramite via ormonale. Sostanze come: insulina, glicocorticoidi e testosterone sono infatti molto attive sulla muscolatura scheletrica (Bergamini, 1969; Adolfsson, 1973).

L'azione del testosterone sul metabolismo muscolare è stata studiata particolarmente a livello dell'elevatore dell'ano di ratto dove uno degli effetti più evidenti è rappresentato dall'aumento del contenuto di glicogeno (Bergamini et al., 1969; Adolfsson, 1973). Ciò è stato riscontrato anche se in misura minore, a livello di altri muscoli scheletrici. Tuttavia, il meccanismo di tale effetto sarebbe differente nell'elevatore dell'ano, rispetto agli altri muscoli scheletrici (Bergamini, 1975). Infatti, nel primo ci sarebbe una diretta stimolazione della sintesi del glicogeno, mentre nei secondi l'effetto sarebbe una conseguenza indiretta dell'interferenza del testosterone con altri organi. In entrambi i casi il meccanismo di accumulo del glicogeno sarebbe dovuto ad un incremento della fosforilazione del glucosio e dell'attività di enzimi deputati alla sintesi del glicogeno stesso (Bergamini et al., 1969). Inoltre va evidenziato che il trat-

tamento con testosterone (Janda et al., 1976) previene il decremento delle deidrogenasi del ciclo di Krebs (malato deidrogenasi, succinato deidrogenasi) durante ischemia cronica.

Ulteriori studi sul gastrocnemio e sul quadricipite di ratto (Rogozkin, 1979) hanno messo in evidenza un netto aumento della sintesi delle proteine muscolari (sia sarcoplasmatiche che miofibrillari) ed aumento dell'attività della RNA polimerasi nucleare. Quindi, nel muscolo scheletrico, le sostanze androgene sono strettamente coinvolte nella regolazione della sintesi proteica, esplicando un'azione sull'RNA. Il meccanismo di questa regolazione si svolge a livello nucleare ed è reso possibile dalla presenza di recettori a livello citoplasmatico e nucleare (Krieg, 1976; Rogozkin, 1979). Infatti il complesso steroide-recettore citoplasmatico forma poi un legame con le strutture intranucleari (cioè la cromatina) modulando l'attività della RNA polimerasi I e II DNA dipendenti. L'interazione ormonale a livello nucleare induce cambiamenti di tipo strutturale e funzionale nella cromatina che provocano una interferenza con i processi di trascrizione. Ne deriva un incremento della sintesi di RNA ribosomiale e di RNA messaggero con conseguente aumento della sintesi proteica. Quindi gli steroidi androgeni possono essere considerati come induttori della sintesi proteica nel muscolo scheletrico (Rogozkin, 1979).

Gli effetti del testosterone sulla trascrizione implicherebbero l'attivazione di geni ridondanti o l'aumento della espressione di geni già attivi (Florini, 1970). Il notevole incremento dell'attività di « stampo » della cromatina indotta dal testosterone non ha tuttavia implicato una variazione delle specie proteiche normalmente utilizzate per le sintesi muscolari.

Inoltre, dal momento che il testosterone induce un aumento dell'attività degli enzimi lisosomiali, l'aumento del catabolismo proteico mediato dai lisosomi potrebbe essere un importante fattore concomitante alla risposta anabolica del muscolo scheletrico agli androgeni (Koenig et al., 1980).

La somministrazione esogena di testo-

sterone induce un incremento del suo contenuto nel muscolo scheletrico. La maggior parte del testosterone non è metabolizzata e soltanto piccole quantità di 17-beta-idrossi-5alfa-androstano-3one e 5-alfa-androstano-3alfa-17-beta-diolo sono presenti nel muscolo. Il ruolo del 17-beta-idrossi-5alfa-androstano-3one sembra essere minore, anche se esso rappresenta il principale metabolita del testosterone (Stenstad e Eik-Nes, 1981). In ogni caso non è stata chiarita sufficientemente l'azione del testosterone sui substrati e sugli intermedi del metabolismo energetico. Pertanto in questo studio sul muscolo gastrocnemio di ratto ci siamo proposti di osservare come il trattamento in vivo con testosterone propionato modifichi le concentrazioni di alcuni metaboliti della glicolisi, del ciclo di Krebs, degli aminoacidi correlati e dei mediatori di energia.

## Materiali e metodi

### *Animali e trattamenti*

Tutti gli animali utilizzati furono mantenuti in condizioni ambientali costanti per temperatura ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ), umidità relativa ( $60 \pm 5\%$ ) e ciclo circadiano (12 ore di luce e 12 ore di buio), nutriti con normali diete da laboratorio ed acqua ad libitum.

In una prima serie di esperienze si è valutata l'influenza del fattore « dose ». Pertanto furono utilizzati quattro lotti di ratti maschi (Charles River, ceppo Sprague Dawley) del peso di  $300 \pm 20$  g. Gli animali dei primi tre lotti furono trattati con testosterone propionato in olio di sesamo alle dosi di 0.8-2.0-5.0 mg/kg i.m. pro die per 1 settimana (6 giorni di trattamento). Il quarto lotto, che costituiva gli animali di controllo, fu trattato con il solo veicolo.

In una seconda serie di esperienze si è valutato se, e in quale misura, il fattore « sesso » influenzasse la risposta metabolica muscolare al trattamento con testosterone. Pertanto furono utilizzati due lotti di ratti femmine (Charles River, ceppo Sprague Dawley) del peso di  $250 \pm 20$  g. Il primo lotto di animali fu trattato con testosterone propionato in olio di sesamo alla dose di

5.0 mg/kg i.m. pro die per 1 settimana (6 giorni di trattamento), mentre il secondo lotto di animali fu utilizzato come controllo e trattato con il solo veicolo.

In una terza serie di esperienze si è valutata l'influenza del fattore « tempo » sulla risposta metabolica muscolare al trattamento con testosterone. Pertanto furono utilizzati quattro lotti di ratti maschi (Charles River, ceppo Sprague Dawley) del peso di  $300 \pm 20$  g. I primi tre lotti di animali furono trattati con testosterone propionato in olio di sesamo alla dose di 5.0 mg/kg i.m. pro die per 1, 2, 4 settimane (trattamento 6 giorni alla settimana). Il quarto lotto di animali fu utilizzato come controllo e trattato con il solo veicolo.

#### *Tecnica analitica*

48 ore dopo l'ultimo trattamento gli animali furono anestetizzati con uretano etilico in soluzione fisiologica (1.5 g/kg, i.p.). Il muscolo gastrocnemio venne quindi isolato e, senza interruzione della circolazione sanguigna, venne rapidamente prelevato per mezzo delle « Wollenberger Clamps » (Wollenberger et al., 1960) preventivamente raffreddate in azoto liquido. Il muscolo prelevato venne mantenuto per 2 minuti immerso in azoto liquido.

Il muscolo così congelato venne polverizzato in Microdismembrator (Braun, Melsungen) mediante due passaggi di 45 sec. l'uno. Il muscolo polverizzato e congelato è stato poi rapidamente pesato e diluito 1 : 10 con HC10<sub>4</sub> 0.6 N al fine di ottenere una deproteinizzazione acida. Due passaggi di un min. ciascuno in Ultra-Turrax (Ika-Werk, Staufen) hanno permesso una completa omogenizzazione. Dall'omogenato sono stati prelevati 0.2 ml, sottoposti poi ad idrolisi enzimatica del glicogeno (Keppler e Decker, 1974).

L'omogenato non sottoposto ad idrolisi enzimatica è stato centrifugato a 1500 g, per 15 min.; il surnatante è stato neutralizzato a pH6 con KHCO<sub>3</sub> 2 M e ricentrifugato a 1500 g per altri 15 min. L'estratto così ottenuto, mantenuto alla temperatura di 0-4°C, è stato immediatamente utilizzato per la determinazione di: piruvato (Czok e Lam-

prech, 1974); alfa-chetoglutarato (Bergmeyer e Bernt, 1974); L-alanina (Williamson, 1974); glutamato (Witt, 1974); ione ammonio (Kun e Kearney, 1974); ATP e creatinfosfato (Lamprecht et al., 1974) lattato (Gutmann e Wahlefeld, 1974); ADP e AMP (Jaworek et al., 1974); succinato (Williamson e Corkey, 1969); citrato (Lowry e Passonneau, 1972); malato (Gutmann e Wahlefeld, 1974); glucoso 6-fosfato, glucoso, glicogeno (Bergmeyer et al., 1974); la carica energetica potenziale (Atkinson, 1968) fu espressa come  $([ATP] + 0.5 [ADP])/([ATP] + [ADP] + [AMP])$ .

#### *Analisi statistica*

Per la prima serie di esperienze (fattore « dose ») l'analisi statistica è stata condotta sui valori ottenuti dai lotti di ratti maschi trattati per una settimana con veicolo oppure con testosterone propionato, a tre diversi livelli di dose: 0.8; 2.0; 5.0 mg/kg i.m.. Mediante l'analisi della varianza (ANOVA), ogni lotto dei trattati è stato confrontato con il lotto dei controlli per ciascuno dei 17 metaboliti saggiati. Eventuali correlazioni dose/effetto sono state valutate mediante il test di linearità.

Per la seconda serie di esperienze (fattore « sesso ») l'analisi statistica è stata condotta sui valori ottenuti dai lotti di ratti maschi e femmine trattati per una settimana con veicoli oppure con testosterone propionato alla dose di 5.0 mg/kg i.m. Mediante ANOVA, per ciascuno dei 15 metaboliti saggiati sono stati effettuati i confronti fra: (a) ratti femmine trattati e ratti femmine di controllo; (b) ratti femmine trattati e ratti maschi trattati; (c) ratti femmine di controllo e ratti maschi di controllo. Mediante l'analisi di classificazione multipla (MCA) si sono valutati gli effetti netti sui singoli metaboliti dovuti al fattore « sesso » od al fattore « trattamento » (veicolo verso testosterone) utilizzando l'ETA<sup>2</sup>: ciò ha indicato la proporzione di variazione di ogni singolo metabolita attribuibile al fattore in causa.

Per la terza serie di esperienze (fattore in causa « tempo di trattamento ») l'analisi statistica è stata condotta sui valori ottenuti dai lotti di ratti maschi

controlli e trattati con testosterone (5.0 mg/kg) rispettivamente per 1, 2 e 4 settimane. Mediante ANOVA, per ciascuno dei 16 metaboliti saggiati, sono stati effettuati i confronti fra: (a) controlli verso trattati, per ogni tempo di trattamento (1, 2 e 4 settimane); (b) controlli e trattati per una settimana verso controlli trattati per 2 o 4 settimane. Mediante MCA si è valutata la proporzione di variazione di ogni singolo metabolita dovuta al fattore « trattamento » ed al fattore « tempo di invecchiamento » dell'animale. La eventuale correlazione « tempo/effetto » è stata saggiata mediante il test di linearità.

## Risultati

La Tabella 1 mostra l'effetto del trattamento con testosterone propionato a tre diverse dosi (0.8; 2.0; 5.0 mg/kg, i.m.) per 6 giorni di trattamento su alcuni metaboliti del muscolo scheletrico di ratto maschio. L'analisi della varianza « tra gruppi » ha evidenziato alla dose di 0.8 mg/kg i.m. una diminuzione del malato ( $P < 0.05$ ) ed alla dose di 2.0 mg/kg i.m. una diminuzione sia del glucoso-6-fosfato ( $P < 0.05$ ) che dello ione ammonio ( $P < 0.01$ ). Per quanto riguarda il glucoso-6-fosfato, il test di linearità ha evidenziato che il suo valore diminuisce linearmente all'aumentare della dose. Per quanto riguarda l'ATP, pur non essendoci stata alcuna variazione significativa riscontrabile con la ANOVA, il test di linearità ne ha evidenziato la tendenza ad un aumento lineare in funzione della dose.

In Tabella 2 sono riportati i dati relativi ad 1 settimana di trattamento con testosterone propionato alla dose di 5.0 mg/kg i.m. su ratti femmine e su ratti maschi. Variazioni significative tra i ratti femmine trattati e quelli di controllo sono state evidenziate mediante l'ANOVA: (a) per quanto riguarda la glicolisi, con una diminuzione del lattato ( $P < 0.01$ ); (b) per quanto riguarda gli intermedi del ciclo degli acidi tricarbossilici, con un aumento dell'alfa-chetoglutarato ( $P < 0.01$ ) ed una diminuzione del succinato ( $P < 0.05$ ); (c) per quanto riguarda i mediatori di energia, con una diminuzione del creatinfosfato ( $P <$

0.01). L'analisi della classificazione multipla con il calcolo dell'ETA<sup>2</sup> ha evidenziato che la differenza nel contenuto di alcuni metaboliti nei ratti sia maschi che femmine trattati con testosterone (alla dose di 5.0 mg/kg) sono dovute in parte al sesso, e in parte al fatto che il trattamento con testosterone ha agito con incisività diversa, a seconda del sesso, sui diversi metaboliti. Comunque, già in condizioni di base sono evidenti delle differenze legate al sesso; infatti nelle femmine esiste una concentrazione maggiore di glucoso ( $P < 0.01$ ), piruvato ( $P < 0.01$ ), lattato ( $P < 0.01$  e succinato ( $P < 0.05$ ), mentre sono presenti in minor concentrazione alfa-chetoglutarato ( $P < 0.01$ ), ATP ( $P < 0.01$ ), creatinfosfato ( $P < 0.01$ ) e carica energetica ( $P < 0.05$ ).

Per quanto riguarda il contenuto muscolare di glucoso, questo è risultato maggiore ( $P < 0.01$ ) nelle femmine rispetto ai maschi e le differenze sono da imputarsi al sesso (ETA<sup>2</sup> = 73%) piuttosto che al trattamento. Per il piruvato, le differenze ( $P < 0.01$ ) sono attribuibili non solo al sesso (ETA<sup>2</sup> = 41%) ma anche al trattamento (ETA<sup>2</sup> = 10%): le femmine sembrano essere più sensibili al testosterone che determina un aumento della concentrazione del piruvato stesso. Per gli intermedi del ciclo degli acidi tricarbossilici, si è rilevato che a seguito del trattamento il citrato diminuisce più marcatamente nei maschi ( $P < 0.01$ ) nei quali il contenuto è comunque minore rispetto a quello delle femmine. La concentrazione di alfa-chetoglutarato nelle femmine è sensibile all'azione del testosterone (ETA<sup>2</sup> = 35%), mentre non lo è nei maschi. Il contenuto di ATP è più alto nei maschi rispetto alle femmine ( $P < 0.01$ ) e ciò è da attribuirsi più al sesso (ETA<sup>2</sup> = 64%) che al trattamento (ETA<sup>2</sup> = 1%); per l'ADP ( $P < 0.05$ ) non vi sono grandi differenze dovute al sesso (ETA<sup>2</sup> = 25%), ma piuttosto una diversa risposta al testosterone che agisce più marcatamente nelle femmine. La concentrazione muscolare di creatinfosfato, che nelle femmine è già fisiologicamente minore che nei maschi (ETA<sup>2</sup> = 80%), diminuisce ulteriormente sotto l'azione del trattamento con testosterone ( $P < 0.01$ ).

TABELLA I - Valutazioni sul muscolo gastrocnemio di ratti maschi delle concentrazioni di alcuni metaboliti glicolitici, intermedi del ciclo di Krebs, aminoacidi e mediatori di energia in condizioni di controllo e dopo 1 settimana di trattamento alle dosi 0.8-2.0-5.0 mg/kg i.m. con testosterone propionato. Le concentrazioni sono espresse per il glicogeno in  $\mu\text{moli/unità glicosidiche/g}$  tessuto fresco, mentre per gli altri parametri in  $\mu\text{moli/g}$  tessuto fresco.

Metaboliti	Testosterone		
	Controlli (n = 8)	0.8 mg/kg (n = 7)	5.0 mg/kg (n = 7)
Glicogeno	36.099 ± 1.641	35.485 ± 1.950	35.731 ± 1.659
Glucoso	1.435 ± 0.114	1.444 ± 0.074	1.318 ± 0.106
Glucoso-6-fosfato	1.154 ± 0.080	1.145 ± 0.105	0.961 ± 0.074
Piruvato	0.087 ± 0.006	0.089 ± 0.008	0.094 ± 0.011
Lattato	2.171 ± 0.234	2.744 ± 0.294	1.573 ± 0.268
Lattato/Piruvato	24.557 ± 3.822	33.885 ± 5.585	16.244 ± 2.522
Citrato	0.225 ± 0.017	0.231 ± 0.012	0.184 ± 0.021
$\alpha$ -chetoglutarato	0.062 ± 0.006	0.060 ± 0.006	0.062 ± 0.005
Succinato	0.192 ± 0.024	0.189 ± 0.020*	0.176 ± 0.020
Malato	0.134 ± 0.019	0.091 ± 0.010	0.098 ± 0.016
Glutamato	1.677 ± 0.076	1.660 ± 0.092	1.745 ± 0.118
Alanina	1.372 ± 0.112	1.376 ± 0.115	1.332 ± 0.102
Ione Ammonio	0.793 ± 0.058	0.742 ± 0.074	0.718 ± 0.059
ATP	6.337 ± 0.291	6.653 ± 0.244	7.030 ± 0.247
ADP	0.699 ± 0.019	0.685 ± 0.032	0.696 ± 0.021
ANP	0.031 ± 0.004	0.035 ± 0.004	0.031 ± 0.005
CP	20.027 ± 0.817	20.602 ± 0.804	20.959 ± 0.406
ECP	0.945 ± 0.004	0.949 ± 0.002	0.952 ± 0.002

I risultati sono espressi come media ± errore standard.

Le differenze tra gli animali di controllo e quelli trattati sono state effettuate con l'analisi della varianza (ANOVA): \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

TABELLA II - Valutazioni sul muscolo gastrocnemio di ratti maschi e femmine delle concentrazioni di alcuni metaboliti glicolitici, intermedi del ciclo di Krebs, aminoacidi e mediatori di energia in condizioni di controllo e dopo la settimana di trattamento alla dose di 5.0 mg/kg i.m. con testosterone propionato. Le concentrazioni sono espresse per il glicogeno in  $\mu\text{moli/unità}$  di glicosidiche/g tessuto fresco, mentre per gli altri parametri in  $\mu\text{moli/g}$  tessuto fresco.

Metaboliti	Ratti maschi		Ratti femmine	
	Controlli (n = 8)	5.0 mg/kg (n = 7)	Controlli (n = 8)	5.0 mg/kg (n = 7)
Glicogeno	36.099 ± 1.641	35.731 ± 1.659	35.297 ± 1.703 <sup>3**</sup>	35.864 ± 1.617
Glucosio	1.435 ± 0.114	1.318 ± 0.106 <sup>2**</sup>	2.923 ± 0.218 <sup>3**</sup>	2.696 ± 0.204
Glucoso-6-fosfato	1.154 ± 0.080	0.961 ± 0.074 <sup>2**</sup>	1.189 ± 0.126	1.143 ± 0.054
Piruvato	0.087 ± 0.006	0.094 ± 0.011	0.121 ± 0.009 <sup>3**</sup>	0.140 ± 0.013
Lattato	2.171 ± 0.234	1.573 ± 0.268	3.476 ± 0.290 <sup>3**</sup>	2.364 ± 0.322 <sup>1*</sup>
Lattato/Piruvato	24.557 ± 3.822	16.244 ± 2.522	30.387 ± 3.925	16.606 ± 2.792
Citrato	0.225 ± 0.017	0.184 ± 0.021 <sup>2*</sup>	0.268 ± 0.018	0.255 ± 0.015 <sup>1**</sup>
α-chetoglutarato	0.062 ± 0.006	0.062 ± 0.005 <sup>2**</sup>	0.026 ± 0.004 <sup>3**</sup>	0.041 ± 0.003 <sup>1**</sup>
Succinato	0.192 ± 0.024	0.176 ± 0.020	0.271 ± 0.022	0.218 ± 0.014 <sup>1*</sup>
Glutamato	1.677 ± 0.076	1.745 ± 0.118	1.707 ± 0.181	1.979 ± 0.170
Ione Ammonio	0.793 ± 0.058	0.718 ± 0.059	0.823 ± 0.044	0.800 ± 0.045
ATP	6.337 ± 0.291	7.030 ± 0.247 <sup>2**</sup>	4.704 ± 0.337 <sup>3**</sup>	4.394 ± 0.141
ADP	0.699 ± 0.019	0.696 ± 0.021	0.645 ± 0.021	0.613 ± 0.028
AMP	0.031 ± 0.004	0.031 ± 0.005	0.037 ± 0.004	0.032 ± 0.005
CP	20.027 ± 0.817	20.959 ± 0.406 <sup>2**</sup>	13.679 ± 0.409 <sup>3**</sup>	12.349 ± 0.450 <sup>1**</sup>
ECP	0.945 ± 0.004	0.952 ± 0.002 <sup>2**</sup>	0.932 ± 0.004 <sup>3**</sup>	0.933 ± 0.002

I risultati sono espressi come media + errore standard.

L'analisi statistica è stata effettuata con l'analisi della varianza (Anova): femmine controllo versus femmine trattate: 1; femmine trattate versus maschi trattati: 2; maschi controllo versus femmine controllo: 3; \* P<0.05; \*\* P<0.01.

TABELLA III - Valutazioni sul muscolo gastrocnemio di ratti maschi delle concentrazioni di alcuni metaboliti glicolitici, intermedi del ciclo di Krebs, aminoacidi e mediatori di energia in condizioni di controllo e dopo 1, 2, 4 settimane di trattamento alla dose di 5.0 mg/kg i.m. con testosterone propionato. Le concentrazioni sono espresse per il glicogeno in  $\mu\text{moli/unità glicosidiche/g}$  tessuto fresco, mentre per gli altri parametri in  $\mu\text{moli/g}$  tessuto fresco.

Metaboliti	Tempo di trattamento							
	1 settimana		2 settimana		4 settimana		4 settimana	
	Controlli (n = 8)	Trattati (n=7)	Controlli (n = 8)	Trattati (n=7)	Controlli (n = 8)	Trattati (n=7)	Controlli (n = 8)	Trattati (n=7)
Glicogeno	36.099±1.641	35.731±1.659	29.987±2.453	28.600±1.503	28.195±0.968 <sup>▲</sup>	27.568±1.701 <sup>▲</sup>		
Glucosio	1.435±0.114	1.318±0.106	1.798±0.179	1.480±0.046	1.755±0.094	1.522±0.148		
Glucosio-6-fosfato	1.154±0.080	0.961±0.074	1.043±0.109	0.830±0.126	0.530±0.040 <sup>▲</sup>	0.777±0.092		
Piruvato	0.087±0.006	0.094±0.011	0.116±0.023	0.109±0.009	0.088±0.012	0.070±0.006 <sup>▲</sup>		
Lattato	2.171±0.234	1.573±0.268	2.507±0.567	2.336±0.353	2.243±0.355	2.063±0.161		
Lattato/Piruvato	24.557±3.822	16.244±2.522	27.522±4.497	23.201±3.785	27.095±3.233	29.219±3.108		
Citrato	0.225±0.017	0.184±0.021	0.282±0.033	0.252±0.029	0.202±0.024	0.187±0.019		
$\alpha$ -chetoglutarato	0.062±0.008	0.062±0.005	0.054±0.008	0.051±0.005	0.038±0.006 <sup>○</sup>	0.034±0.003 <sup>▲</sup>		
Succinato	0.192±0.020	0.176±0.024	0.234±0.034	0.206±0.018	0.136±0.017	0.128±0.017 <sup>▲</sup>		
Malato	0.134±0.019	0.098±0.016	0.190±0.032	0.132±0.014	0.104±0.020	0.062±0.006 <sup>▲</sup>		
Glutamato	1.677±0.076	1.745±0.118	1.368±0.137	1.309±0.119	1.305±0.036 <sup>▲</sup>	1.315±0.058 <sup>▲</sup>		
Alanina	1.372±0.112	1.332±0.102	1.387±0.168	1.392±0.134	1.049±0.067	0.914±0.050 <sup>▲</sup>		
Ione Ammonio	0.793±0.058	0.718±0.059	0.711±0.127	0.578±0.068	0.486±0.031 <sup>▲</sup>	0.486±0.032 <sup>▲</sup>		
ATP	6.337±0.291	7.030±0.247	6.195±0.416	6.008±0.292	5.177±0.187 <sup>▲</sup>	5.244±0.119 <sup>▲</sup>		
ADP	0.699±0.019	0.696±0.021	0.624±0.041	0.585±0.038	0.485±0.018 <sup>▲</sup>	0.487±0.009 <sup>▲</sup>		
AMP	0.031±0.005	0.031±0.005	0.029±0.006	0.041±0.002	0.020±0.004	0.025±0.003 <sup>▲</sup>		
CP	20.027±0.817	20.959±0.406	17.998±1.107	18.137±0.939	15.444±0.536 <sup>▲</sup>	15.023±0.267 <sup>▲</sup>		
ECP	0.945±0.004	0.952±0.002	0.950±0.002	0.950±0.001	0.954±0.001 <sup>○</sup>	0.953±0.001		

I risultati sono espressi come media + errore standard.

L'analisi statistica è stata effettuata con l'analisi della varianza (Anova): <sup>▲</sup> P<0.05; <sup>▲</sup> P<0.01, e con il test di linearità: <sup>○</sup> P<0.05 e <sup>●</sup> P<0.01. Le significatività saggiata sono state convenientemente indicate sui valori relativi alle 4 settimane.

Circa la carica energetica potenziale, per la quale si è riscontrato un valore più alto nei maschi piuttosto che nelle femmine ( $P < 0.01$ ), la differenza è da attribuirsi più al sesso ( $\text{ETA}^2 = 56\%$ ) che al trattamento ( $\text{ETA}^2 = 3\%$ ).

In Tabella 3 sono rappresentati i risultati relativi all'azione del testosterone (5.0 mg/kg i.m.) somministrato per 1, 2, 4 settimane (6 giorni di trattamento alla settimana) nei ratti maschi. L'analisi della varianza non ha evidenziato, ai singoli tempi, alcuna differenza significativa tra i ratti di controllo e i ratti trattati. Mediante l'ANOVA « tra gruppi » è stato valutato l'effetto del fattore « tempo » sulla concentrazione dei metaboliti e, qualora ciò sia risultato presente, mediante il test di linearità è stato determinato se tale valore tende a diminuire o ad aumentare durante il tempo di osservazione. Nei ratti di controllo il contenuto muscolare di glicogeno e di glucoso-6-fosfato mostrò una netta diminuzione ( $P < 0.01$ ). Analogamente ci fu una diminuzione lineare nel tempo dell'alfa-chetoglutarato ( $P < 0.05$ ), del glutamato ( $P < 0.01$ ), dello ione ammonio ( $P < 0.01$ ), dell'ATP ( $P < 0.01$ ), dell'ADP ( $P < 0.01$ ) e del creatinfosfato ( $P < 0.01$ ).

Negli animali trattati per 1, 2 o 4 settimane con il testosterone, il glicogeno ha mostrato una diminuzione lineare nel tempo ( $P < 0.01$ ) da attribuirsi più al fattore tempo che al fattore dose; il piruvato, pur mostrando variazioni statisticamente significative ( $P < 0.05$ ), non ha assunto un andamento lineare nel tempo. Analogamente il succinato ed il malato hanno evidenziato variazioni significative ( $P < 0.05$ ), ma con andamento sinusoidale, mentre l'alfa-chetoglutarato ha mostrato una diminuzione lineare nel tempo ( $P < 0.01$ ). Infine il trattamento con testosterone ha determinato variazioni significative sia per gli intermedi del metabolismo aminoacidico che per i mediatori di energia; in tutti i casi si è trattato di una diminuzione dei valori nel corso delle quattro settimane di trattamento ( $P < 0.01$ ), diminuzione che si è manifestata linearmente nel tempo ( $P < 0.01$ ) ad eccezione dell'AMP che ha mostrato, invece, un andamento sinusoidale. Per tutti i

metaboliti saggiati le variazioni sono da attribuirsi principalmente al fattore « tempo di osservazione » ad eccezione dell'alanina sulla quale anche il fattore « dose » ha giocato un ruolo importante.

## Discussione

Gli effetti del testosterone sul muscolo scheletrico di ratti maschi sono stati studiati in relazione sia al fattore « dose » (0.8 - 2.0 - 5.0 mg/kg) che al fattore « tempo di trattamento » (trattamenti di 1, 2, 4 settimane alla dose di 5.0 mg/kg). Inoltre, per evidenziare le possibili influenze del fattore « sesso » sono stati confrontati i dati ottenuti da ratti maschi (trattati per una settimana alla dose di 5.0 mg/kg i.m.) con quelli rilevati in ratti femmine. Dai dati ottenuti sui ratti maschi trattati con testosterone alle tre dosi (per una settimana di somministrazione) si evidenzia che nel muscolo gastrocnemio il trattamento non ha determinato quell'aumento della concentrazione di glicogeno descritto sul muscolo elevatore dell'ano (Adolfsson, 1973; Bergamini, 1975). Tale discrepanza è probabilmente dovuta ai differenti muscoli esaminati ed al fatto che i presenti dati sono stati ottenuti su ratti adulti normali e, pertanto, non orchiettomizzati come nei casi citati in letteratura. Le variazioni nelle concentrazioni del glucoso-6-fosfato, del malato e dello ione ammonio sono state riscontrate alle dosi inferiori (0.8 oppure 2.0 mg/kg i.m.) mentre sono risultate assenti alla dose superiore (5.0 mg/kg). Ciò fa supporre la presenza di meccanismi farmaco-induttivi dose-dipendenti, atti ad interferire con il metabolismo del testosterone o con la risposta farmacologica.

La somministrazione di testosterone a ratti femmine (alla dose di 5.0 mg/kg i.m.) ha evidenziato il diverso comportamento rispetto ai ratti maschi. È stato infatti riscontrato che, per la maggior parte dei metaboliti, le differenze sono dovute soprattutto al fattore « sesso » e non al fattore « trattamento », conseguentemente al fatto che già in condizioni di base sono riscontrabili differenze nel contenuto dei metaboliti tra ratti maschi e femmine. Anche la valu-

tazione delle possibili interazioni tra il fattore « tempo di osservazione » ed il fattore « trattamento » con testosterone ha mostrato che le variazioni riscontrate nella concentrazione dei metaboliti sono imputabili soprattutto al fattore « tempo ».

Nel complesso si evidenzia che negli animali normali il testosterone somministrato i.m. per tempi diversi e per dosi diverse non ha indotto sostanziali modificazioni per quanto riguarda sia i substrati e gli intermedi della glicolisi, sia gli aminoacidi correlati, sia i mediatori di energia. Per questi parametri biochi-

mici, si può concludere che la « sovrapposizione » dell'effetto farmacologico del testosterone ad una condizione di normalità non evidenzia quelle azioni « fisiologiche » rilevabili in caso di somministrazione del testosterone in condizioni di deficit ormonale sperimentalmente indotto.

#### Ringraziamenti

Si ringrazia la Sig.ra G. Garlaschi, il Sig. L. Maggi e il Sig. G. Arioli per l'assistenza tecnica.

#### Indirizzo degli Autori:

Prof. Gianni Benzi  
Istituto di Farmacologia  
Facoltà di Scienze MM.FF.NN.  
Università di Pavia  
Piazza Botta, 11  
27100 Pavia

#### BIBLIOGRAFIA

Adolfsson S.: Effects of insulin and testosterone on glycogen synthesis and glycogen synthetase activity in rat levator ani muscle. *Acta physiol. scand.* 88, 234-247 (1973).

Atkinson D.E.: The energy charge of the adenylate pool as regulatory parameter. Interaction with feed-back modifiers. *Biochemistry* 7, 4030-4034 (1968).

Bergamini E.: Additive effects of testosterone and insulin on glycogen content and 2-deoxyglucose phosphorylation in rat levator ani muscle. *Biochim. biophys. Acta* 177, 235-240 (1969).

Bergamini E., Bombara G. and Pellegrino C.: The effect of testosterone on glycogen metabolism in rat levator ani muscle. *Biochim. biophys. Acta* 177, 220-234 (1969).

Bergamini E.: Different mechanism in testosterone action on glycogen metabolism in rat perineal and skeletal muscles. *Endocrinology* 96, 77-84 (1975).

Bergmeyer H.U. and Bernt E.: 2-Oxoglutarato. UV Spectrophotometric Determination. In Bergmeyer, H.U. (Ed.). *Methods of enzymatic analysis*, pp. 1577-1580. Academic Press Inc., New York and London (1974).

Bergmeyer H.U., Bernt E., Schmidt F. and Stork H.: Determination with hexokinase and glu-

- cose-6-phosphate dehydrogenase. In Bergmeyer, H.U. (Ed.). *Methods of enzymatic analysis*, pp. 1196-1201. Academic Press Inc., New York and London (1974).
- Czok R. and Lamprecht W.: Pyruvate, Phosphoenolpyruvate and D-Glycerate-2-phosphate. In Bergmeyer, H.U. (Ed.). *Methods of enzymatic analysis*, pp. 1446-1451. Academic Press Inc., New York and London (1974).
- Florini J.R.: Effects of testosterone on qualitative pattern of protein synthesis in skeletal muscle. *Biochemistry* 9 (4), 909-912 (1970).
- Gutmann I. and Wahlefeld A.W.: L-lactate. Determination with lactate dehydrogenase and NAD. In Bergmeyer, H.U. (Ed.). *Methods of enzymatic analysis*, pp. 1464-1468. Academic Press Inc., New York and London (1974).
- Gutmann I. and Wahlefeld A.W.: L(-)-malate. Determination with malate dehydrogenase and NAD. In Bergmeyer, H.U. (Ed.). *Methods of enzymatic analysis*, pp. 1585-1589. Academic Press Inc., New York and London (1974).
- Janda J., Mrhová O., Urbanová D. and Linhart J.: The effect of anabolic hormone 19-nortestosterone propionate on the metabolism of striated muscle during experimental ischaemia. *Pflüg. Arch. ges. Physiol.* 361, 159-163 (1976).
- Jaworek D., Gruber W. and Bergmeyer H.U.: Adenosine-5'-diphosphate and adenosine-5'-monophosphate. In Bergmeyer, H.U. (Ed.). *Methods of enzymatic analysis*, pp. 2127-2131. Academic Press Inc., New York and London (1974).
- Keppler D. and Decker K.: Glycogen. Determination with amyloglucosidase. In Bergmeyer, H.U. (Ed.). *Methods of enzymatic analysis*, pp. 1127-1131. Academic Press Inc., New York and London (1974).
- Koenig H., Goldstone A. and Lu C.Y.: Androgens regulate mitochondrial cytochrome c oxidase and lysosomal hydrolases in mouse skeletal muscle. *Biochem. J.* 192, 349-353 (1980).
- Kun E. and Kearney E.B.: Ammonia. In Bergmeyer, H.U. (Ed.). *Methods of enzymatic analysis*, pp. 1802-1806. Academic Press Inc., New York and London (1974).
- Krieg M.: Characterization of the androgen receptor in the skeletal muscle of the rat. *Steroids* 28, 261-274 (1976).
- Lamprecht W., Stein P., Heinz F. and Weisser H.: Determination with Creatine kinase, hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. In Bergmeyer, H.U. (Ed.). *Methods of enzymatic analysis*, pp. 1777-1781. Academic Press Inc., New York and London (1974).
- Lowry O.H. and Passonneau J.V.: A flexible system of enzymatic analysis, pp. 157-158. Academic Press Inc., New York and London (1972).
- Rogozkin V.: Metabolic effects of anabolic steroid on skeletal muscle. *Medicine and Science in Sports*. 11, 160-163 (1979).
- Stenstad P. and Eik-Nes K.B.: Androgen metabolism in rat skeletal muscle in vitro. *Biochim. biophys. Acta* 663, 169-176 (1981).
- Williamson D.H.: Determination with alanine dehydrogenase. In Bergmeyer, H.U. (Ed.). *Methods of enzymatic analysis*, pp. 1679-1682. Academic Press Inc., New York and London (1974).
- Williamson J.R. and Corkey B.E.: Determination with succinate thiokinase, pyruvate kinase, and lactate dehydrogenase. In Colowick, S.P. and Kaplan N.O. (Eds.). *Methods in Enzymology*, pp. 458-462. Academic Press Inc., New York (1969).
- Witt I.: Determination with glutamate dehydrogenase and the 3-acetylpyridine analogue of NAD(APAD). In Bergmeyer H.U. (Ed.). *Methods of enzymatic analysis*, pp. 1713-1715. Academic Press Inc., New York and London (1974).
- Wollenberger A., Ristau O. and Schoffa G.: Eine einfache technik der extrem schnellen abkühlung grösserer Gewebestücke. *Pflüg Arch. ges. Physiol.* 270, 399-412 (1960).