

In vivo und in vitro Hydroxylierung von Androgenen in Ratten nach Leberschädigung und Nahrungskarenz

In vivo and in vitro hydroxylation of testosterone and dihydrotestosterone in rats after liver damage and starvation

Martin Wenzel und Ursula Lemm

Pharmazeutisches Institut, Biol.-Chem. Abteilung, Freie Universität Berlin, Königin-Luise-Straße, D-1000 Berlin 33

Z. Naturforsch. **35 c**, 995–998 (1980); eingegangen am 22. Mai 1980

Hydroxylation, Steroid-Hormone, Tritium Water, Liver Damage

The *in vivo* C-2-hydroxylation of testosterone and 5-dihydrotestosterone in rats was measured by labilisation of tritium as HTO after injection of [1α , 2α -T]testosterone or [1α , 2α -T] 5α -dihydrotestosterone (radiospirometry).

After experimental liver damage caused by CCl_4 or after starvation for 60 h the hydroxylation of the androgens decreased. Similar results were gained by measuring the C-2-hydroxylation of testosterone, 5α -dihydrotestosterone and estradiol.

Einleitung

Bei Ratten ist nach Leberschädigung die Hydroxylierung von Steroiden vermindert [1–3]. Auch nach Nahrungsentzug kann eine verminderte Steroid-Metabolisierung auftreten [4]. Die meisten Versuche zur Steroid-Metabolisierung nach Leberschädigung wurden *in vitro* durchgeführt. Entsprechende *in vivo*-Befunde liefern eine Vielzahl von klinischen Untersuchungen zum Steroid-Stoffwechsel nach Leberschädigung. Übersicht in 5, 6.

Mit Hilfe einer früher beschriebenen Methode zum Nachweis von Steroid-Hydroxylierungen, die für *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen geeignet ist [7, 8], sollte die Frage der verminderten Steroid-Hydroxylierung nach Leberschädigung speziell bei den Androgenen tierexperimentell untersucht werden. Besonders interessierte dabei eine Gegenüberstellung der Verhältnisse *in vivo* und *in vitro*.

Material und Methodik

Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten männliche und weibliche Wistar-Ratten der Fa. Hagemann, Bösingfeld/Hannover. Die erwachsenen Ratten hatten ein mittleres Gewicht von 200 g. Sie erhielten Altromin

und Wasser ad libitum. Für die Versuche wurden die Tiere wie folgt vorbehandelt:

1. Sie hatten entweder 60 Stunden keine Nahrung, aber Wasser *ad libitum* bekommen oder
2. es wurde an zwei aufeinanderfolgenden Tagen alle 12 Stunden je 0,5 ml CCl_4 /kg subkutan injiziert und am 3. Tag der Versuch durchgeführt [9].

Substanzen

Nichtmarkierte Steroide stammten von den Firmen E. Merck, Darmstadt oder Schering AG, Berlin. Die radioaktiven Substanzen wurden von der Fa. Buchler, Amersham, bezogen und hatten folgende spezifische Radioaktivitäten:

[1α , 2α -T]Testosteron	49 Ci/mmol;
[1α , 2α -T] 5α -Dihydrotestosteron	47 Ci/mmol;
[$2,4,6,7$ -T]Östradiol	85 Ci/mmol;
[$6,7$ -T]-Östradiol	40 Ci/mmol.

Vor der Verwendung der radioaktiven Steroide erfolgte eine chromatographische Reinheitskontrolle [10]. Außerdem wurde die spezifische Radioaktivität durch Zugabe von nichtradioaktiven Steroiden um den Faktor 10^2 – 10^4 gesenkt.

Inkubationen mit Leberschnitten

Ein Inkubationsansatz bestand aus 1,3 ml Krebs-Ringer-Phosphat-Puffer, pH 7,4, 50 mg Gewebeschnitten als Enzymquelle und dem Steroid (0,01 bis 0,1 mM). Die Steroide wurden – gelöst in 90-prozen-

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. M. Wenzel.
0341-0382/80/1100-0995 \$ 01.00/0



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

tigem Äthanol – der für den Versuch insgesamt bereiteten Puffermenge zugemischt.

Die Inkubationen wurden durch Einbringen der Gefäße in Eis gestoppt. Anschließend wurde das gebildete HTO durch Gefrierdestillation abgetrennt. Bei allen Versuchen wurden mindestens 4 Ansätze, die außer Gewebe alle Komponenten enthielten, zur Kontrolle mitinkubiert und aufgearbeitet.

Radiospirometrie

Die entsprechende Menge an Tritium-markiertem Steroid wurde den Tieren – gelöst in 90proz. Äthanol/0,9-proz. NaCl 1:1 (v/v) – i. p. injiziert. Das Gewinnen der Körperwasserproben und die Bestimmung des HTO-Gehaltes im Atemwasser sind an anderer Stelle ausführlich beschrieben [3].

Berechnung der Steroid-Hydroxylierung aus dem gebildeten HTO

Bei den hier verwendeten Tritium markierten Steroid-Substraten wird selbst bei vollständiger Hydroxylierung an C-2 nur ein Teil der im Molekül befindlichen T-Atome als HTO freigesetzt, da Tritium außer an C-2 auch an anderen Positionen des Steroid-Moleküls eingebaut ist. Wenn man dieses berücksichtigt, kann man aus dem %-Anteil der gebildeten HTO-Aktivität (100% = eingesetzte Tritium-Aktivität des Steroids) den %-Anteil des an C-2 hydroxylierten Steroids berechnen.

Für die Substrate $[1\alpha,2\alpha\text{-T}]$ Testosteron und $[1\alpha,2\alpha\text{-T}]$ Dihydrotestosteron gilt:

$$\% \text{ Hydroxylierung an C-2} \cong \% \text{ HTO} \cdot 2.$$

Voraussetzung ist, daß alles gebildete HTO nur von der 2α -Position stammt und kein Tritium aus der 1α -Position freigesetzt wird. Nach früheren Untersuchungen [7] ist diese Annahme berechtigt.

Für die Hydroxylierung von Östradiol an C-2 gilt folgende Überlegung:

$$\begin{aligned} & \% \text{ HTO aus } [2,4,6,7\text{-T}]\text{-Östradiol} \\ & \text{minus } \% \text{ HTO aus } [6,7\text{-T}]\text{-Östradiol} \\ & = \text{Differenz HTO in } \% \text{ (Tritium aus Pos. 2} \\ & \text{und/oder 4).} \end{aligned}$$

Setzt man voraus, daß keine Hydroxylierung an C-4 eintritt, so ergibt sich:

$$\begin{aligned} & \% \text{ Hydroxylierung an C-2} \\ & = \text{Differenz HTO in } \% \cdot 2. \end{aligned}$$

Die Voraussetzung scheint ebenfalls zutreffend, da Ball *et al.* [11] beim Studium der Hauptwege der Östradiol-Hydroxylierung in Rattenleber keine an C-4 hydroxylierten Östradiol-Derivate nachweisen konnte.

Ergebnisse und Diskussion

Die Hydroxylierung von Testosteron und Dihydrotestosteron an C-2 bei unbehandelten Ratten und Meerschweinchen ist bereits beschrieben worden [7, 8, 12]. In dieser Arbeit wurde die HTO-Bildung aus $[1\alpha,2\alpha\text{-T}]$ Testosteron und $[1\alpha,2\alpha\text{-T}]5\alpha$ -Dihydrotestosteron *in vivo* (Radiospirometrie) und in Leberschnitten gemessen, nachdem die Tiere durch Tetrachlorkohlenstoff (Leberschädigung) oder durch Nahrungsentzug über 60 Stunden vorbehandelt waren. Abb. 1 zeigt die entsprechende Zeit-Umsatz-Kurve mit Dihydrotestosteron als Substrat. Man erkennt zunächst die schon früher beschriebene

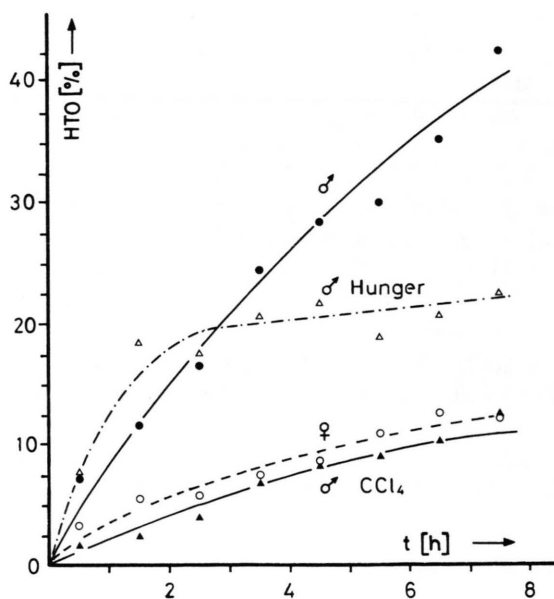


Abb. 1. *In vivo* Hydroxylierung von 5α -Dihydrotestosteron in Ratten (δ) nach Nahrungskarenz und Schädigung der Leber durch CCl_4 . $[1\alpha,2\alpha\text{-T}]5\alpha$ -Dihydrotestosteron wurde den Ratten i. p. injiziert und anschließend das labilisierte Tritium im Körperwasser bzw. in der Atemluft bestimmt (Radiospirometrie; $n = 2$). Ordinate: Konzentration von HTO pro ml Kondenswasser der Atemluft in %. 100% \cong injizierte Tritium-Aktivität (als T-markiertes Steroid) pro ml Körperwasser des Tieres (Körperwasser = 66% des Gewichtes). Injizierte Steroidmenge: Kontrolle (δ und η): $14 \mu\text{g/kg} \cong 4.8 \mu\text{Ci/Tier}$. Nach Nahrungskarenz: $27 \mu\text{g/kg} \cong 6 \mu\text{Ci/Tier}$. Nach Tetrachlorkohlenstoff-Gabe: $22 \mu\text{g/kg} \cong 7 \mu\text{Ci/Tier}$.

Tab. I. Hydroxylierung von Testosteron, Dihydrotestosteron und Östradiol in Rattenleber. In 1,3 ml Krebs-Ringer-Phosphatpuffer pH 7,4 waren enthalten: 50 mg Leberschnitte (δ) und Tritium markiertes Steroid-Substrat (ca. 0,5–1 μ Ci) mit 10^{-5} bzw. 10^{-4} mol/l. Es wurde 10 min bei 37 °C inkubiert und das gebildete HTO durch Gefrierdestillation abgetrennt. Die gemessene HTO-Radioaktivität diente zur Berechnung der Hydroxylierung der Tritium-markierten Steroide. Bei der Berechnung wurde vorausgesetzt, daß das gebildete HTO ausschließlich von C-2 Atom stammt (Berechnungsmodus vergl. Methodik). Substrate: [1α , 2α -T]Testosteron bzw. [1α , 2α -T]Dihydrotestosteron; zum Bestimmen der Hydroxylierung von Östradiol wurden parallele Ansätze mit [$2,4,6,7$ -T]Östradiol und [$6,7$ -T]Östradiol durchgeführt. Leberschädigung mit Tetrachlorkohlenstoff und Nahrungskarenz vergl. Methodik. Zahlen in nmol Hydroxylierungsprodukt pro g Leber pro Minute ($\bar{x} \pm \sigma$ für $n = 4$).

Hydroxylierungsprodukt: Substrat-Konz. [mol/l]	2α -OH-Testosteron		2α -OH-Dihydrotestosteron		2-OH-Östradiol
	10^{-5}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-4}
normale Leber (Kontrolle)	2,70 \pm 0,08	25,1 \pm 3,1	2,57 \pm 0,1	38,2 \pm 4	24,5 \pm 2
Leberschädigung (CCl ₄)	1,00 \pm 0,05	5,1 \pm 0,5	1,60 \pm 0,2	16,9 \pm 1	13,4 \pm 0,8
Nahrungskarenz (60 h)	0,71 \pm 0,03	4,5 \pm 0,2	0,98 \pm 0,9	15,6 \pm 0,4	13,0 \pm 0,7

Sexualspezifität der Hydroxylierung an C-2 [8]. Bei männlichen Ratten ist die 2α -Hydroxylierung 7 Stunden nach der Injektion aufgrund der Hungerperiode auf $\frac{1}{2}$ und nach Lebervergiftung durch Tetrachlorkohlenstoff-Injektion auf $\frac{1}{4}$ des Kontrollwertes eingeschränkt.

Die Ergebnisse nach Injektion von [1α , 2α -T]-Testosteron sind ähnlich, daher wird auf eine Abbildung verzichtet.

Tab. I vergleicht die *in vitro*-Hydroxylierung an C-2 von Testosteron, 5α -Dihydrotestosteron und Östradiol in Rattenleber unter verschiedenen Bedingungen, da ein derartiger Vergleich unseres Wissens nicht bekannt ist.

Wie die Tabelle zeigt, ist bei einer Substrat-Konzentration von 10^{-4} mol/l in normaler Rattenleber die Hydroxylierungsrate (in nmol pro g Leber pro Minute) bei Testosteron und Östradiol etwa gleich groß. Dihydrotestosteron wird dagegen schneller hydroxyliert.

Nach Leberschädigung durch Tetrachlorkohlenstoff und nach Nahrungskarenz ist sowohl *in vitro* als auch *in vivo* für alle 3 untersuchten Steroide eine verminderte Hydroxylierung nachweisbar. Beim Testosteron ist dieser Effekt am stärksten ausgeprägt. *In vivo* und *in vitro* Ergebnisse zeigen eine Parallelität, ein quantitativer Vergleich erscheint jedoch – wie bereits in [8] diskutiert – kaum möglich.

Carella *et al.* [1] fanden nach Leberschädigung (durch Orotsäure) durch *in vitro* Untersuchungen eine verringerte 2α -Hydroxylierung von 5α -Androstan- 3α , 17β -diol. Da sowohl durch Tetrachlorkohlenstoff [14] als auch durch Orotsäure [1] der Cyto-

chrom P-450 Spiegel sinkt, kann dies die Ursache für die verminderte Androgen-Hydroxylierung sein. Ferner könnte die verminderte Biosynthese von Pyridin-nucleotiden nach Tetrachlorkohlenstoff-Gabe [15, 16] eine Rolle spielen.

Für den stärkeren Abfall der Hydroxylierung nach Leberschädigung und Fasten beim Dihydrotestosteron und besonders bei Testosteron im Vergleich zum Östradiol (vgl. Tab. I) haben wir keine Erklärung.

Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, daß die Vorbehandlung von Ratten mit Barbiturat zu einer *vermehrten* Hydroxylierung von Östradiol und Testosteron führt [18].

Der Abfall der Hydroxylierungsrate nach 60stündigem Fasten ist durch Befunde von Schriefers *et al.* [17] erklärbar:

Bei Nahrungskarenz fällt die Glukose-6-Phosphat Produktion und damit die NADPH-Lieferung auf $\frac{1}{6}$ der Norm. Die Auswirkung auf die Androgen-Hydroxylierung ist aber begrenzt, weil bei dieser Reaktion nicht nur NADPH, sondern auch NADH als Coenzym wirkt [7].

Die Ursache für die Hemmung der Steroid-Hydroxylierung ist für die biologische Bedeutung dieses Effektes ohne Belang. Ist der Abbau von Testosteron und 5α -Dihydrotestosteron durch die oben besprochenen Faktoren inhibiert, so wird die biologische Halbwertszeit der Steroide verlängert und damit ihre Konzentration nicht nur in der Leber, sondern auch im Plasma sowie in anderen Organen erhöht.

Dadurch kann der Östradiol-Stoffwechsel direkt beeinflusst werden. Schon eine relativ geringfügige

Zunahme der Testosteron-Konzentration führt zu einem Anstieg des Östradiol/Östron-Quotienten in der Leber [20].

Außerdem können Änderungen des Testosteron-Spiegels indirekt die Konzentration an *freiem* Östradiol beeinflussen, da Testosteron und Östradiol um die gleichen Steroid-bindenden Serumproteine (SBP) konkurrieren. Da Testosteron und DHT stärker vom SBP gebunden werden als Östradiol [19] und sich ihre Konzentration nach Leberschädigung infolge verminderter Hydroxylierung erhöht, muß man eine Zunahme von freiem Östradiol im Serum erwarten. Tatsächlich konnte Levin *et al.* einen An-

stieg des Östradiol-Spiegels durch das verstärkte Uterus-Wachstum nach Leberschädigung durch Tetrachlorkohlenstoff nachweisen [2]. Zwar kann man für die Zunahme des Östradiol-Spiegels – wie Levin – allein die verminderte Östradiol-Hydroxylierung nach Leberschädigung verantwortlich machen, die oben beschriebene Interdependenz dürfte jedoch den Effekt wesentlich verstärken. Möglicherweise ergibt sich hieraus eine plausible Erklärung für die Frage, warum eine verminderte Metabolisierung von männlichen *und* weiblichen Steroid-Hormonen, wie sie nach Leber-Schädigung auftritt, oft zur verstärkten Ausprägung *femininer* Merkmale führt.

- [1] M. Carella, J. Björkhem, J. Gustafson, K. Einarsson u. K. Hellström, *Biochem. J.* **158**, 89–95 (1976).
- [2] W. Levin, R. Welch u. A. Conney, *J. Pharmacol. Exp. Therapeutics* **173**, 247–255 (1970).
- [3] M. Wenzel, K. U. Blum u. E. Kraas, *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* **6**, 265–268 (1968).
- [4] H. Schriefers, E. Wassmuth u. K. Lauffs, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **350**, 183–190 (1969).
- [5] H. Adlercreutz, *Endocrinology* **46**, 129–163 (1970).
- [6] H. Kley, W. Wiegmann, E. Nieschlag u. H. Kruskemper, *Dtsch. Med. Wochenschr.* **101**, 1295–1298 (1976).
- [7] M. Wenzel u. U. Lemm, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **357**, 1145 (1976).
- [8] U. Lemm u. M. Wenzel, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **359**, 81–88 (1978).
- [9] H. Sasame, J. Castro u. J. Gillette, *Biochem. Pharmacol.* **17**, 1759–1763 (1968).
- [10] Messung von radioaktiven und stabilen Isotopen (H. Simon, Herausgeber), Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1974.
- [11] P. Ball, H. O. Hoppen u. R. Knuppen, *Hoppe Seyler's Physiol. chem.* **355**, 1451–1462 (1974).
- [12] U. Lemm und M. Wenzel, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **360**, 35–38 (1979).
- [13] M. Wenzel, L. Pitzel u. P. E. Schulze, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **350**, 341–348 (1969).
- [14] J. Tsyrlow u. V. Lyakhovich, *Chem. Biol. Interact.* **10**, 77–89 (1975).
- [15] J. Gibb u. B. Sawyer, *Biochem. Pharmacol.* **16**, 2047–2052 (1967).
- [16] G. Brenner, *Arzneimittelforschung* **18**, 1153–1155 (1968).
- [17] H. Schriefers, E. Wassmuth u. K. Lauffs, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **350**, 183–190 (1969).
- [18] M. Wenzel, G. Köster u. J. Hönicke, *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* **8**, 231–234 (1970).
- [19] U. Westphal, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **359**, 431–447 (1978).
- [20] M. Wenzel, L. Pitzel u. B. Riebelmann, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **356**, 459–468 (1975).