

Karol Dziubek\*

**Zawartość glutationu w jądrach *Rana temporaria* L.  
w czasie hibernacji  
oraz w pierwszym okresie życia aktywnego na lądzie.  
Doniesienie wstępne**

Streszczenie

W jądrach *Rana temporaria* L. oznaczano poziom glutationu (GSH) w czasie hibernacji oraz w pierwszym okresie życia aktywnego płazów na lądzie. Ilość GSH określano zarówno w jednym gramie badanej tkanki, jak również w całych jądrach. Wykazano znaczny choć stopniowy jego spadek w miarę upływu okresu hibernacji, a także znaczny jego wzrost w okresie pory godowej.

Na podstawie uzyskanych wyników w pracy dyskutowane są zależności pomiędzy ilością GSH a aktywnością śródmięszkowych komórek i procesem spermatogenezy.

**WSTĘP**

Dotychczas przeprowadzono badania nad metabolizmem GSH w krwi, mózgu, wątrobie, nerkach i oocytach *R. temporaria* L. w cyklu rocznym. Badania te były wykonywane na żabach pochodzących z ich naturalnego środowiska, jak również na takich, które poddawano stresowi głodzenia, dehydratacji i temperatury (Dziubek, 1986a,b,c).

Badania te wykazały, że poziom GSH jest zmienny i poza oocytami osiąga na ogół maksymalne wartości w okresie życia aktywnego płazów na lądzie, zaś minimalne w okresie hibernacji, gdy płazy przebywają w niskiej temperaturze otoczenia i nie pobierają pokarmu. Tak więc poziom GSH u tego gatunku płazów wydaje się być dodatnio skorelowany z ich metaboliz-

\* Zakład Fizjologii Zwierząt Instytutu Biologii Wyższej Szkoły Pedagogicznej w Krakowie, ul. Podbrzezie 3

mem. Dotyczy to również oocytów, których metabolizm nie wykazuje jednak zależności wprost proporcjonalnej do temperatury (Dziubek, 1986c).

W związku z powyższym interesujące wydaje się być pytanie, czy podobne zależności pomiędzy aktywnością metaboliczną a poziomem GSH mogą również występować w gonadach samców *R. temporaria* L. Gonady samców *R. temporaria* L. są miejscem biosyntezy androgenów (Christensen i Gillim, 1969; Lofts, 1972), jak i produkcji plemników. Biosynteza androgenów dokonuje się w komórkach śródmiąższowych, których aktywność jest zmienna w ciągu roku; charakteryzuje się wysoką aktywnością w czasie jesieni i zimy, zaś niską na wiosnę i całkowitym zanikiem w miesiącach letnich. U *Rana temporaria* L. i *Rana esculenta* L. aktywność śródmiąższowych komórek jest dodatkowo skorelowana z rozwojem modzeli godowych i jest bezpośrednio regulowana hormonami wydzielanymi z części gruczołowej przysadki, głównie zaś LH (Basu i Nandi, 1965; Lofts, 1961), co ostatecznie wykazano u ssaków.

Sezonowe zmiany w biosyntezie androgenów jądrowych są także ściśle skorelowane z sezonowym cyklem śródmiąższowych lipidów. Popiera to hipotezę, że akumulacja silnie cholesterolowo pozytywnych lipidów w tych komórkach, która występuje po porze godowej, jest wskaźnikiem obniżenia się syntezy androgenów (Lofts, 1968; Oordt i Kort, 1969).

Podobnie jak w przypadku śródmiąższowych komórek, wykazano także ścisłą korelację pomiędzy aktywnością przysadki a sezonowymi zmianami w nabłonku nasieniowtórczym u samców *R. temporaria* L. (Oordt, 1965). Wykazano bowiem, że usunięcie całej przysadki lub tylko jej części dystalnej wywołuje zanik jąder (Lofts, 1961). Burgos (1950) zaobserwował, że usunięcie dystalnej części przysadki zawsze powoduje dezintegrację spermatyd (komórek macierzystych plemników) w nabłonku nasieniowtórczym, co prowadzi w konsekwencji do postępującej dezintegracji powstawania spermatocytów, które powstają ze spermatogonii w wyniku mitozy. Dezintegracja

spermatogonii polega na zaniku ich mitotycznej aktywności, który u *R. temporaria* L. potwierdził Oordt (1956). Ten sam autor (1961) wykazał w badaniach histochemicznych, że wycięcie przysadki w czasie wysokiej aktywności spermatogenetycznej powoduje w znacznie wyższym stopniu dezintegracyjne zmiany w spermatogoniach. Nie zatrzymuje to jednak procesu formowania się pewnej liczby wiązek plemników, co pozwala sugerować, że sam proces spermiogenezy może być niezależny od wpływów gonadotropicznych.

Zanik jąder, wywołany usunięciem gruczołowej części przysadki, może być zahamowany przez podanie wyciągów przysadki płazów albo przez implantację przysadek tych zwierząt (Oordt, 1965). Hormonalna terapia w przypadku żab z wyciętymi przysadkami wykazuje, że istnieją sezonowe różnice w reakcji jąder na hormony gonadotropowe. I tak gdy wyciągi przysadkowe uzyskane ze zwierząt podczas zimy wstrzykiwano w innych okresach, taka sama ilość ekstraktów wywoływała większą aktywność spermatogenetyczną u zwierząt w okresie lata, niż w zimie. Podobnie gdy ekstrakty przysadkowe pochodziły od żab z okresu lata, to także większą wrażliwość na nie wykazywały żaby w lecie. Jedynie w przypadku *R. pipiens* największą czułość na wyciągi przysadkowe notowano u żab z zimy (Basu i Nandi, 1965).

Brak korelacji pomiędzy cyklem spermatogenezy a cyklem interstycjalnych komórek, zdaniem Oordt i de Kort (1969) może być zależny od temperatury, która w różny sposób uczyła te dwie tkanki na gonadotropiny przysadkowe. I tak w zimie śródmięszowe komórki reagują silniej na cyrkulujące gonadotropiny, zaś w okresie podniesienia się temperatury otoczenia na wiosnę i w lecie wywołują one wzrost czułości nabłonka nasieniotwórczego na gonadotropiny, hamując tym samym aktywność komórek śródmięszowych. Zostało to potwierdzone przez Kortę (1971) u *R. esculenta* L., który wykazał, że iniekcje LH do organizmu tego gatunku w niskich temperaturach bardziej pobudzają śródmięszową tkankę do aktywności.

Nasuwa się więc pytanie, czy poza temperaturą są i inne czynniki uczulające w podobny sposób śródmiąższową tkankę i nabłonek nasieniowców na gonadotropiny w ciągu cyklu rocznego R. temporaria L. Być może, takim czynnikiem jest GSH, którego metabolizm również jest dodatnio skorelowany z temperaturą u tego gatunku (Dziubek, 1986a,b). Próba odpowiedzi na powyższe pytanie jest treścią tej pracy.

## MATERIAŁ I METODYKA BADAN

Badania przeprowadzono na 80 dojrzałych płciowo samcach R. temporaria L., pochodzących bezpośrednio z ich naturalnego środowiska. Płazy łowiono zawsze w 1 dekadzie każdego miesiąca, począwszy od października do maja, uwzględniając charakterystyczne okresy w życiu płazów, a mianowicie: hibernację, porę godową i początkowy okres życia aktywnego płazów na lądzie. Materiał doświadczalny obejmował płazy o podobnej długości ciała, tj. około 7,5 cm.

Bezpośrednio po przewiezieniu żab do pracowni, zabijano je przez dekapitację, zawsze o tej samej porze dnia. Następnie wypreparowane jądra ważono i homogenizowano w homogenizatorze teflonowym w 0.1 M buforze fosforanowym o pH 7.4 zawierającym 10 mM EDTA. Uzyskane homogenaty wirowano przez 15 minut przy 15 tys. obr./min. w temperaturze 4°C. Z kolei próbki supernatantów badanych jąder odbiałczano w 10% TCA w obecności 10 mM EDTA i po odwirowaniu uzyskane supernatanty przeznaczano do oznaczania GSH.

Poziom GSH oznaczano metodą Ellmana (1959) w supernatantach jąder. W metodzie tej używano DTNB, który reagując z grupami -SH daje żółte zabarwienie pochodzące od kwasu nitrobenzoesowego (TNB). Jego natężenie mierzono spektrofotometrycznie, przy długości fali 412 nm. Ponadto prześledzono także zmiany ciężaru jąder w badanych okresach badawczych. Z tak uzyskanych danych wyliczono średnie arytmetyczne i odchylenia standardowe.

## WYNIKI

Wszystkie dane liczbowe zestawiono w tab. 1 oraz zilustrowano na fig. 1. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono zmiany ilości GSH w badanych jądrach R. temporaria L. w okresie hibernacji, pory godowej i w pierwszym okresie życia aktywnego płazów na lądzie. Natomiast w okresie pory godowej zanotowano znaczny wzrost poziomu GSH, który obniżył się w 1 dekadzie maja, po wyjściu żab z wody i rozpoczęciu przez nie życia na lądzie.

Wykazano także zmiany ciężaru jąder w badanym okresie, mianowicie maksimum ciężaru w 1 dekadzie stycznia i minimum po zakończeniu pory godowej. Spadek ciężaru jąder począwszy od 1 dekady stycznia jest dodatnio skorelowany z przebiegiem średnich ilości GSH z wyjątkiem pory godowej. W początkowym okresie hibernacji ta korelacja była również ujemna.

## DYSKUSJA

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono spadek zawartości GSH w jądrach samców R. temporaria L. w miarę postępowania hibernacji oraz znaczny jego wzrost w okresie pory godowej.

U R. temporaria L., tak jak u wielu zwierząt poikilotermicznych, spermatogenetyczna aktywność rozpoczyna się po kilku tygodniach od momentu zakończenia pory godowej. W miesiącach letnich kanaliki nasieniowórcze są już w zasadzie wypełnione dużą ilością cyst nasieniowórczych w różnych stadiach rozwojowych. Jesienią procesy powstawania nowych cyst ulegają zahamowaniu, a te cysty, które powstały w czasie lata dojrzewają i formują się w pęczki plemników. W ten sposób przed nastaniem zimy jądra są już wyposażone w plemniki, przeznaczone do zapładniania komórek jajowych, w czasie nadchodzącej pory godowej. Histologiczne badania

Tabela 1

Zmiany ilości glutationu zredukowanego (GSH) w jądrach Rana temporaria L. w okresie hibernacji i w początkowym okresie życia aktywnego na lądzie

Okres badawczy	ciężar jąder/mg	uM GSH/2 jądrach	uM GSH/g
październik	690 <sup>±</sup> 29.899	2.191 <sup>±</sup> 0.220	3.177 <sup>±</sup> 0.243
listopad	714 <sup>±</sup> 68.602	2.129 <sup>±</sup> 0.397	2.986 <sup>±</sup> 0.491
grudzień	745 <sup>±</sup> 62.473	2.103 <sup>±</sup> 0.293	2.885 <sup>±</sup> 0.430
styczeń	707 <sup>±</sup> 36.527	1.941 <sup>±</sup> 0.328	2.741 <sup>±</sup> 0.845
luty	639 <sup>±</sup> 24.738	1.511 <sup>±</sup> 0.788	2.362 <sup>±</sup> 0.267
marzec	554 <sup>±</sup> 55.704	1.237 <sup>±</sup> 0.483	2.234 <sup>±</sup> 0.423
kwiecień	501 <sup>±</sup> 60.658	1.998 <sup>±</sup> 0.317	4.092 <sup>±</sup> 0.702
maj	122 <sup>±</sup> 17.262	0.219 <sup>±</sup> 0.066	1.849 <sup>±</sup> 0.066
Test F <sub>o</sub>	348,120 <sup>x</sup> F/7,72/	135,315 <sup>x</sup> F/7,72/	328,730 <sup>x</sup> F/7,72/

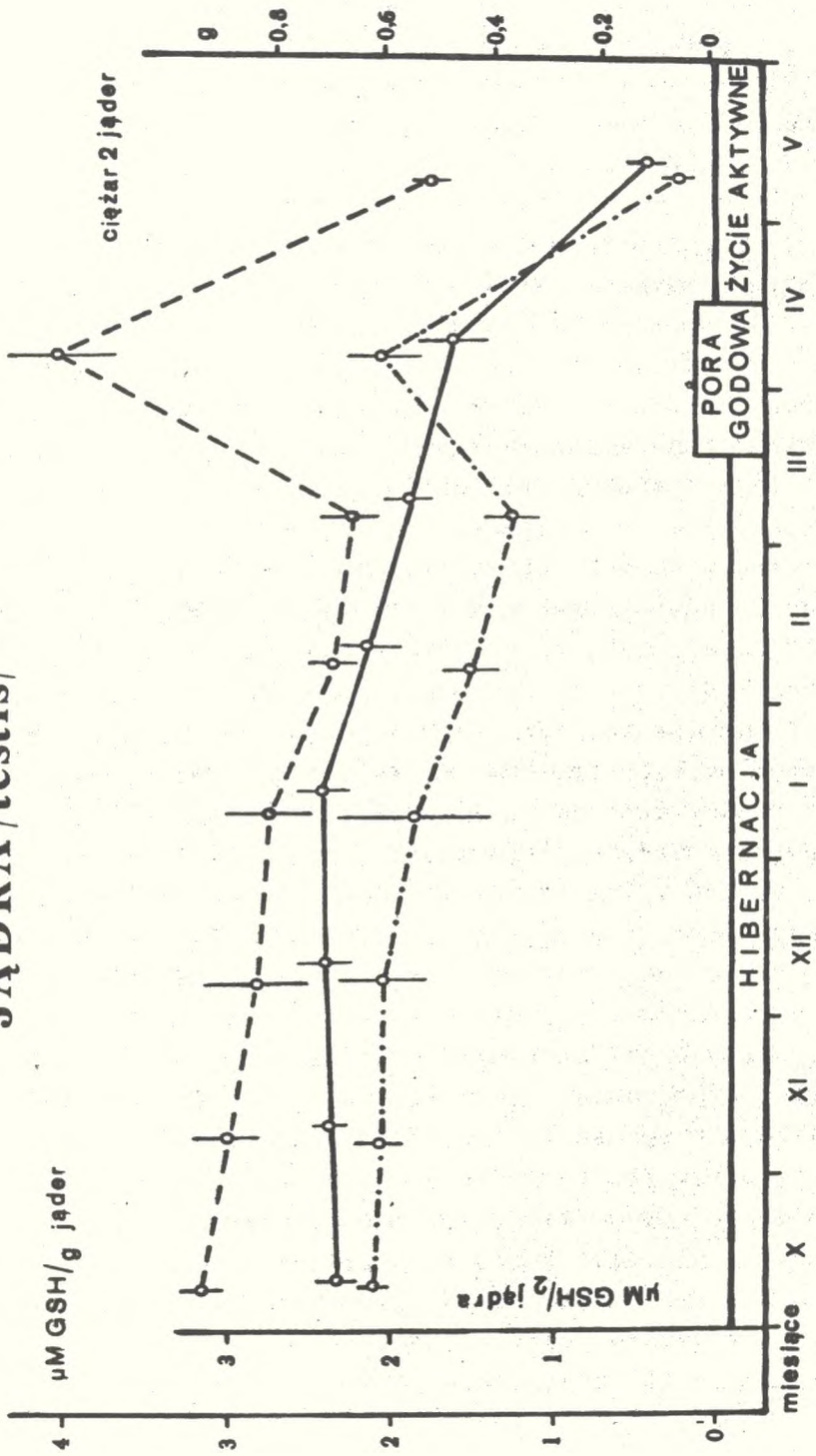
Każda grupa badawcza zawierała po 10 samców.

<sup>x</sup> statystycznie istotne przy  $P \leq 0.001$ .



Fig. 1. Zmiany zawartości glutationu (GSH) w jądrach (testis) samców R. temporaria L. oraz zmiany ich ciężaru w okresie hibernacji, pory godowej i w początkowym okresie życia aktywnego na lądzie. Oznaczenia: linia przerywana -  $\mu\text{M GSH/g}$  jąder, linia przerywana z kropkami -  $\mu\text{M GSH}$  w obu jądrach, linia ciągła - ciężar jąder w mg

## JĄDRA /testis/



jąder w tym czasie ujawniły w kanalikach nasieniowców brak cyst nasieniowców; stwierdzono jedynie nieliczne nieaktywne pierwszorzędowe spermatogonie, pomiędzy komórkami Sertoliego i wiązkami plemników (Lofts, 1974).

Spermatogonie pomiędzy październikiem a styczniem znajdują się w pobliżu spermatogenetycznej powierzchni i tylko wyjątkowo dzielą się mitotycznie. To zimowe zahamowanie spermatogenezy uwidacznia się w prawie stałym ciężarze jąder i stałej średnicy kanalików nasieniowców (Oordt, 1956).

Stwierdzony więc w okresie hibernacji stopniowy spadek poziomu GSH w badanych jądrach R. temporaria L. wydaje się być bardzo wyraźnie skorelowany ze spadkiem spermatogenezy u tego gatunku, jak również z obniżonym ciężarem jąder. Ta wyraźna korelacja sugeruje to, co już wcześniej stwierdzono w innych narządach R. temporaria L., że ilość GSH może być uważana za marker ich metabolicznej aktywności (Dziubek, 1986a,b), jako że ten trójpeptyd, głównie dzięki grupie -SH, uczestniczy w utrzymaniu właściwej struktury i funkcji wielu enzymów (Kosower, 1976). Właściwości te, zwłaszcza u zwierząt poikilotermicznych, wydaje się jednak ograniczać temperatura otoczenia (Dziubek, 1976b), która, jak wiadomo, nawet u ssaków posiada znaczny wpływ na tempo metabolizmu (Freeman i inni, 1985). Niższa temperatura wydaje się zawsze ograniczać poziom syntezy GSH, jak również syntezy białka w przeciwieństwie do podwyższonej temperatury (Dziubek, 1986b, Russo i inni, 1984).

Podobnie jak w przypadku oocytów (Dziubek, 1986c), w miarę postępowania okresu hibernacji, także w badanych jądrach wykazano spadek ilości GSH. Spadek ten jest jednak nieznaczny, a sam poziom GSH stosunkowo wysoki i wydaje się być wystarczający do tego, aby już powstałe i ostatecznie ukształtowane plemniki uchronić przed procesami autooksydacji, do eliminacji nadtlenków lipidów i wolnych rodników powstających w wyniku przemian metabolicznych (Mitchell i Jollow, 1975). Interesujący wydaje się być wzrost ilości GSH w okre-



się pory godowej. Być może jest to związane z faktem, że GSH jest potrzebny do utrzymania odpowiednio wysokiej żywotności plemników, a także może być czynnikiem stymulującym ich ruch, może więc decydować o efektywności procesu zapłodnienia oocytów.

Uzyskane dane wydają się być interesujące i dlatego, że wykazany poziom GSH jest ujemnie skorelowany z cyklem interstycjalnych komórek, które, jak wiadomo, u badanego gatunku wykazują maksymalną aktywność w okresie hibernacji (Lofts, 1961).

#### LITERATURA

1. Basu S.L., Nandi J., 1965, Effects of testosterone and gonadotropins on spermatogenesis in *Rana pipiens* Schreber. J. EXP. Zool. 159, 93-112.
2. Burgos M.H., 1950, Regulation hormonal de los caracteres sexuales secundarios en el sapo macho. Rev. Soc. Argent. 26, 359-371.
3. Dziubek K., 1986a, Glutathione metabolism in selected organs of *Rana temporaria* L. in the annual cycle and different stresses. Part. I. Dehydration effects. In press.
4. Dziubek K., 1986b, Glutathione metabolism in selected organs of *Rana temporaria* L. in the annual cycle and different stresses. Part. II. Starvation and temperature effects. In press.
5. Dziubek K., 1986c, Glutathione metabolism in selected organs of *Rana temporaria* L. in the annual cycle and different stresses. Part. III. In the development of oocytes. In press.
6. Ellman G.L., 1959, Tissue sulfhydryl group. Arch. Biochem. Biophys. 82, 70-77.

7. Freeman M.L., Malcolm A.W., Meredith M.J., 1985, Glutathione pool size affects cell survival after hyperthermic treatment. *Cell Biol. Toxicol.* 1, 213-221.
8. Christensen A.K., Gillim S.W., 1969, The correlation of fine structure and function in steroid-secreting cells with emphasis on those of the gonads. In "The Gonads" (K.W. Mc Kerne ed.). pp. 415-488. North-Holland, Amsterdam.
9. De Kort E.J.M., 1971. Het interstitium testis bij de groene kikker, *Rana esculenta*: Een histometrisch en histochemisch onderzoek. Grafisch Bedrijf Fa Lammers en Zn., Terborg.
10. Kosower E.M., 1976. Chemical properties of glutathione, In *Glutathione: Metabolism and Function*. (Aries I.M., Jakoby W.B. eds), pp. 1-16. Raven Press. New York.
11. Lofts B., 1961, The effects of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone on the testis of hypophysectomized frogs (*Rana temporaria*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 1, 179-189.
12. Lofts B., 1968, Patterns of testicular activity. In: *Perspectives in Endocrinology: Hormones in the Lives of Lower Vertebrates* (E.J.W. Barrington and C. Barker Jørgensen eds), pp. 239-304. Academic Press. New York.
13. Lofts B., 1972, The Sertoli cell. *Gen. Comp. Endocrinol. Suppl.* 3, 636-648.
14. Lofts B., 1974, *Physiology of the amphibia*. Academic Press. New York. London.
15. Mitchell J.R., Jollow D.J., 1975, Metabolic activation drugs toxic substance. *Gastroenterology.* 68, 392-410.
16. Van Oordt P.G.W.J., 1956, Regulation of the spermatogenic cycle in the common frog (*Rana temporaria*), van Der Wiel. Arnhem.
17. Van Oordt P.G.W.J., 1961, The gonadotrophin producing and other cell types in the distal lobe of the pituitary of the common frog, *Rana temporaria*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1, 364-374.

18. Van Oordt P.G.W.J., 1965, Cyclical changes in the gonadotropin producing cells of the pituitary, and their implication for the regulation of the sexual cycle in the male common frog *Rana temporaria*. Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp. 54, 630-631.
19. Van Oordt P.G.W.J., Dongen W. Ivan, Lofts B., 1968, Seasonal changes in endocrine organs of the male common frog, *Rana temporaria*, I. The pars distalis of the adenohypophysis. Z. Zellforsch. 88, 549-559.
20. Van Oordt P.G.W.J., De Kort E.J.M., 1969, Functions of gonadotropins in adult amphibia. In La Spécificité zoologique des hormones hypophysaires et de leurs activités. (M. Fontaine ed.). pp. 345-350. Colloq. Int. Centre Nat. Rech. Sci. 177, 345-350.
21. Russo A., Mitchell J.B., McPherson S., 1984, The effects of glutathione depletion on thermotolerance and heat stress protein synthesis. Br. J. Cancer. 49, 753-758.
22. Tam W.H., Phillips J.G., Lofts B., 1969, Seasonal changes in the in vitro production of testicular androgens by the cobra (*Naja naja*). Gen. Comp. Endocrinol. 13, 117-125.

Karol Dziubek

THE GLUTATHIONE CONTENT IN THE TESTES OF *RANA TEMPORARIA* L.  
IN THE HIBERNATION PERIOD AND IN THE FIRST PHASE  
OF ACTIVE LAND LIFE. INTRODUCTORY REPORT

Summary

In the testes of *Rana temporaria* L. the content of glutathione (GSH) during the hibernation period and in the first phase of active land life of the amphibians has been determined. The GSH content has been determined both, in one

gram of the tissue under study and in whole testes. A significant and gradual decrease in GSH content has been shown, as the hibernation period progressed, with a considerable increase during the breeding period.

On the basis of the obtained results the dependences between the GSH content and the activity of interstitial cells as well as spermatogenesis process are being discussed in the paper.

Кароль Дзюбек

СОДЕРЖАНИЕ ГЛЮТАТИОНА В ЯДРАХ RANA TEMPORARIA L. ВО ВРЕМЯ ГИБЕРНАЦИИ И В ПЕРВОЙ СТАДИИ АКТИВНОЙ ЖИЗНИ НА СУШЕ

### Резюме

В ядрах Rana temporaria L. обозначили уровень глутатиона во время гибернации и в первый период активной жизни земноводных на суше. Уровень глутатиона был определен как в одном грамме осматриваемой ткани, так и в целых ядрах. Было показано значительное и постепенное падение количества глутатиона в течение гибернации со значительным его повышением в период спаривания.

На основе результатов в этой статье обсуждается взаимосвязь количества глутатиона, активности интерстициальных клеток и процесса сперматогенеза.