

# The effect of testosterone on skeletal muscle energy metabolism in diabetic and non-diabetic endurance trained rats

## Citation for published version (APA):

van Breda, E. (1994). *The effect of testosterone on skeletal muscle energy metabolism in diabetic and non-diabetic endurance trained rats*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Rijksuniversiteit Limburg. <https://doi.org/10.26481/dis.19940224eb>

## Document status and date:

Published: 01/01/1994

## DOI:

[10.26481/dis.19940224eb](https://doi.org/10.26481/dis.19940224eb)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

# S ummary

## Summary

Skeletal muscle represents 35-40% of the total body mass and it therefore plays an important role in whole body energy metabolism. Despite the large number of studies dealing with muscle carbohydrate and lipid metabolism, aspects regarding the control of both metabolic pathways remain poorly understood. Especially the role of sex-steroids on muscle carbohydrate and lipid metabolism has not received a great deal of scientific attention. Therefore, the aim of the present thesis was to study the effect of testosterone on skeletal muscle energy metabolic parameters in diabetic and non-diabetic endurance trained female rats. The goals of the study were twofold:

- to investigate the effects of testosterone administration on selected parameters of muscle carbohydrate and lipid metabolism in both sedentary and trained, diabetic and non-diabetic rats.
- to get more insight into the mechanisms by which testosterone acts on muscle carbohydrate and lipid metabolism.

After a brief introduction (**chapter 1**), a general overview of muscle energy metabolism and its endocrine control is described in **chapter 2**.

In **chapter 3** two models were evaluated for their suitability for metabolic studies. Firstly, an isolated mouse skeletal muscle model *in vitro* was studied, in which dissected muscles are incubated in a buffer at 37 °C. This model makes it possible to study particular effects of hormones, uncomplicated by side effects that might occur *in vivo*. Despite the fact, however, that pH, O<sub>2</sub> saturation, and osmolality of the buffer remained stable, histochemical studies of the muscles showed large cores devoid of glycogen, suggesting that the incubated muscles had exhausted their endogenous energy stores during incubation. Further evaluation of the core showed that cells in this region lost their normal shape and positioning with respect to each other. From this study we concluded that caution should be exercised when interpreting the results of studies with intact isolated muscle, incubated at 37 °C. For these reasons we switched to the rat model "*in vivo*". Although we are aware of the drawbacks of this model, i.e. the complicated interaction of hormones with each other on distinct cellular processes, this model represents the true physiological situation of the animal. In order to achieve controlled and fairly constant plasma testosterone levels new drug dosing techniques (i.e. osmotic minipumps, depot drugs preparations and silastic tubes) are available. One major omission in current literature is that only steroid concentrations at the final experimental day are given without taken into consideration possible day-to-day fluctuations in testosterone delivery. In chapter 3 we provided evidence that the use of silastic tubes filled with crystalline testosterone offer a practical and economic alternative for medium-term (14 days) steady state delivery of exogenous testosterone as compared with osmotic minipumps and injections of depot preparations.

In **chapter 4** the effects of testosterone and endurance training, either alone or in combination, on glycogen content and the activities of glycogen synthase, glycogen

phosphorylase, and fructose-6-phosphate kinase were studied in extensor digitorum longus (EDL) and soleus muscles of intact adult female rats. We found that in the soleus, but not in the EDL, glycogen content was increased by training alone which could be explained, at least partly, by a decreased activity of active glycogen phosphorylase and an increased activity of active glycogen synthase.

In both muscles glycogen content of testosterone treated sedentary rats was not changed. Interestingly, in the EDL, but not in the soleus, the glycogen content increased significantly by an increased activity of active glycogen synthase in trained animals chronically treated with testosterone. Finally, we found that in the EDL and soleus of acute exercised testosterone treated animals a significant sparing of glycogen was observed compared with the non-testosterone treated animals. This glycogen-sparing effect could be explained, in part, by an increased ratio of active glycogen synthase to active glycogen phosphorylase in the testosterone treated groups.

**Chapter 5** describes the effects of training and/or testosterone treatment on fatty acid-binding protein (FABP) content, a cytoplasmic protein most likely involved in the intracellular translocation of fatty acids, and cytochrome c oxidase activity in heart, extensor digitorum longus (EDL) and soleus muscles of intact adult female rats. For sake of comparison, samples of heart muscle were included in this study. In the EDL no changes were found upon testosterone treatment alone or in combination with endurance training whereas in the heart FABP content was increased after training, testosterone treatment or both manipulations, and in soleus FABP increased only after testosterone treatment. Among the three muscles studied the FABP content was found to be related to the cytochrome c oxidase activity in a non-linear way. The results of this study indicate that the FABP contents and mitochondrial activities of heart and skeletal muscle are differently affected by training and/or testosterone treatment.

In **chapter 6** the results of a study performed in streptozotocin-induced diabetic female rats are described. It was found that upon testosterone administration up to a pathophysiological concentration (ca. 5 nmol/l), glycogen content was increased in EDL and soleus of diabetic sedentary and diabetic trained rats in concert with an increased glycogen synthase activity. In EDL, but not in the soleus, of the testosterone treated diabetic trained subgroup we found less depletion of glycogen upon acute exercise than in the untreated group. This effect of testosterone could be explained, in part, by an increased glycogen synthase activity together with a relatively smaller increase in glycogen phosphorylase activity.

We concluded that mild hyperandrogenism (plasma testosterone 4-5 nmol/l), acts on energy metabolic parameters of diabetic animals by different mechanisms in glycolytic and oxidative muscle fibres, and that hyperandrogenism in combination with endurance training can help to compensate for diabetes-induced metabolic defects of muscle energy metabolism.

Since it has been shown that testosterone treatment differently affects effects on energy metabolic parameters of glycolytic and oxidative muscle fibres we decided to investigate in **chapter 7** whether the effects of testosterone either alone or in combination with endurance training are caused by: (1) testosterone itself or by its conversion to estradiol-17 $\beta$ ; and/or (2) a shift in muscle fibre composition.

The results showed that the combination of endurance training and testosterone treatment increased the relative number of oxidative muscle fibres (type I) in both EDL and soleus muscle. Furthermore, we showed that the differences between glycolytic and oxidative muscles can be explained, in part, by a different aromatase activity in the muscles examined. After inhibition of the aromatase enzyme complex FABP content, cytochrome c oxidase activity and glycogen content of EDL and soleus muscles are affected by either testosterone or its conversion product estradiol-17 $\beta$ .

From the results of the various studies described in this thesis we conclude that:

- testosterone treatment in control (non-diabetic) does not lead to insulin resistance, as the skeletal muscle glycogen content and glycogen synthase activity are not decreased.
- testosterone administered to insulin resistant diabetic female rats improves glycogenesis in skeletal muscles rather than deteriorating it.
- testosterone induces a glycogen sparing effect in exercised endurance trained diabetic and non-diabetic rats which probably is due to both increased glycogen synthesis and increased fatty acid metabolism.
- testosterone elicits different effects on energy metabolic properties of glycolytic and oxidative muscle fibres.
- the effects of testosterone are mediated, at least partly, by estradiol-17 $\beta$  produced by aromatization of testosterone in heart and skeletal muscle.

# Samenleving

## Samenvatting

Ondanks het gegeven dat ons lichaam voor 35-40% uit skeletspieren bestaat, wordt vaak voorbij gegaan aan de belangrijke rol die de skeletspieren vervullen bij de koolhydraat- en vethomeostase. Met name de controle van zowel het koolhydraat- als het vetmetabolisme in de skeletspieren door hormonen en met name de controle door geslachtshormonen is nog nauwelijks onderzocht.

Het onderzoek dat in dit proefschrift beschreven is, had betrekking op de effecten van het geslachtshormoon testosteron op het spiermetabolisme van vrouwelijke ratten. Dit is van belang daar bij vrouwen, die ten gevolge van bepaalde afwijkingen aan de eierstokken, te veel testosteron produceren meer afwijkingen in met name het koolhydraatmetabolisme worden gevonden. Dit suggereert een mogelijke relatie tussen de plasma testosteronspiegel en het ontstaan van diabetes mellitus. Om deze reden hebben we gekeken naar het effect van testosteron op de opslag van glucose in de vorm van glycogeen (glycogenese) in rust. Verder hebben we gekeken of regelmatige lichamelijke inspanning (training), al dan niet na testosteron behandeling, de glycogeenopslag deed veranderen en of dit mogelijk te maken had met een veranderd vetmetabolisme. Daar de opslag van glucose en het verbruik van vetzuren bij patiënten met diabetes mellitus eveneens verstoord is hebben we onderzocht of een verhoogd testosteron gehalte in het bloed bij diabeet gemaakte ratten de opslag van glucose in glycogeen deed veranderen. Tenslotte hebben we onderzocht of regelmatige inspanning bij deze diabeet ratten een mogelijk gunstig effect heeft op de opslag en/of afbraak van glycogeen en/of vetzuren in de spier.

De belangrijkste doelstellingen van dit proefschrift waren:

- te onderzoeken of testosteron een effect had op de glucose- en vetstofwisseling van de spier bij vrouwelijke diabeet en niet-diabeet ratten.
- het ontrafelen van het mechanisme welke ten grondslag ligt aan de effecten van testosteron op de spiercel.

Na een korte inleiding waarin de doelstellingen van dit proefschrift worden beschreven (**hoofdstuk 1**) wordt in **hoofdstuk 2** een algemeen overzicht gegeven over het energiemetabolisme en de rol van het hormonale systeem daarop.

Doordat er vele hormonen tegelijk in het bloed aanwezig zijn en bekend is dat zij elkaars werking kunnen beïnvloeden hebben we in **hoofdstuk 3** een bestaand model geëvalueerd waarmee de invloed van hormonen op de skeletspier kan worden onderzocht zonder dat er verstoringen optreden van andere hormonen. Dit model, het "in vitro" model, is een veel gebruikt model. Hierbij wordt een spier in een waterige oplossing van 37°C gehangen, waarin zuurstof en voedingsstoffen voor de spier aanwezig waren. Verder bevatte deze oplossing alleen die hormonen die we wilden onderzoeken. Nadere bestudering wees echter uit dat dit model ongeschikt was voor dit type van onderzoek. Na verloop van tijd (30 minuten) bleek dat er in het midden van de spier een gebied ontstond waarin de

spiercellen hun normale vorm bleken te hebben verloren, vermoedelijk door een gebrek aan zuurstof. Dit verschijnsel zou uiteraard de resultaten van het experiment negatief kunnen beïnvloeden. We zijn toen overgeschakeld naar het "hele rat" (*in vivo*) model. Een van de problemen, die we met dit model moesten trachten op te lossen, was de toediening van testosteron aan de rat. In ons onderzoek was het noodzakelijk om gedurende 14 dagen een vrijwel constante testosteron spiegel in het bloed te krijgen en te behouden. Hoewel er op dit moment vele toedieningsmethoden zijn is de goede werking van deze vaak dure methoden niet onomstotelijk bewezen. Daarom hebben we verschillende toedieningsmethoden met elkaar vergeleken. Het bleek dat siliconen slangetjes (binnendiameter 1.47 mm) een beter en tevens goedkoper alternatief zijn voor de toediening van testosteron aan ratten dan andere methoden zoals b.v. het osmotische minipompje.

Door gebruik te maken van de methode om testosteron toe te dienen met siliconen slangetjes, hebben we in **hoofdstuk 4** onderzocht of training, al dan niet in met testosteron behandelde ratten, invloed had op de opslag van glucose in glycogeen. Uit de resultaten bleek dat in een tweetal verschillende onderbeenspieren, t.w. een spier die voornamelijk geschikt is voor krachtige bewegingen, de lange tenen strekker (*extensor digitorum longus*, EDL) en in een spier die voornamelijk gebruikt wordt bij langdurige en daardoor minder krachtige bewegingen, de soleus: (1) training de opslag van glucose in glycogeen in de soleus maar niet in de EDL verhoogde; (2) bij getrainde ratten testosteron het gehalte van glycogeen in de EDL maar niet in de soleus verhoogde en (3) in de met testosteron behandelde getrainde dieren minder glycogeen werd afgebroken tijdens inspanning.

In **hoofdstuk 5** hebben we onderzocht of de in hoofdstuk 4 genoemde effecten van training, met of zonder testosteron, invloed had op het gehalte van een klein eiwit dat zich in de spieren bevindt. Dit vetzuurbindend eiwit (*fatty acid-binding protein*, FABP) speelt mogelijk een belangrijke rol bij het transport van vetzuren in de spiercel. Daar er weinig bekend is over het gehalte FABP in de skeletspieren hebben we ter controle eveneens het FABP gehalte van hartspiermonsters bepaald. Verder hebben we onderzocht of deze interventies invloed hadden op de activiteit van een oxidatief enzym uit de mitochondrieën (*cytochrome c oxidase*). Uit de resultaten bleek dat noch training noch testosteron noch een combinatie van beide het gehalte van het FABP in de EDL deed verhogen. In het hart en in de soleus echter bleek de hoeveelheid FABP bij zowel ongetrainde als getrainde ratten onder invloed van testosteron te stijgen. Tenslotte bleek dat, gemeten aan de hand van de activiteit van het enzyme *cytochrome c oxidase*, er een relatie bestaat tussen het FABP gehalte van de spier en de oxidatieve capaciteit van die spier.

**Hoofdstuk 6** beschrijft de effecten van testosteron, al dan niet in combinatie met training, op het energiemetabolisme in de EDL en soleus bij farmacologisch (*streptozotocine*) geïnduceerde diabetes mellitus bij vrouwelijke ratten. We vonden dat: (1) bij diabete ratten het glycogeen gehalte van de spieren was verlaagd; (2) training een verhoging van het glycogeen gehalte in beide spieren bewerkstelligde; (3) testosteron behandeling eveneens het glycogeen gehalte van beide spieren verhoogde; (3) in diabete ratten het FABP sterk verhoogd was en dat noch training noch testosteron noch een combinatie van beide enige invloed had op het FABP gehalte; en (4) na acute inspanning, dit in tegenstelling met de studie in niet diabete ratten (**hoofdstuk 4**), alleen in de EDL een glycogeen sparend effect van testosteron optrad.



effect van testosteron optrad.

Uit de resultaten van deze studie mogen we concluderen dat verhoging van de plasma testosteron spiegel tot 4 à 5 nmol per liter, dat wil zeggen concentraties die zich in het (patho)fysiologisch gebied bevinden een invloed heeft op zowel het koolhydraat- als de vetstofwisseling bij vrouwelijke diabeten ratten en dat deze effecten verschillend zijn in de verschillende spieren. Tenslotte concluderen we dat training een gunstig effect heeft op de defecten die optreden in de spierstofwisseling van diabeten vrouwelijke ratten.

De in de hoofdstukken 4 t/m 6 beschreven effecten van testosteron op de spierstofwisseling hoeven niet per sé aan de werking van testosteron zelf worden toegeschreven. Testosteron kan namelijk in bijvoorbeeld de eierstokken omgezet (gearomatiseerd) worden tot het vrouwelijke geslachtshormoon oestradiol. Daarom hebben we in **hoofdstuk 7** onderzocht of de effecten van testosteron alleen of in combinatie met training werden veroorzaakt door testosteron zelf of door de omzetting in oestradiol. De resultaten laten zien dat het verhinderen van de omzetting van testosteron naar oestradiol door de omzetting op farmacologische wijze te blokkeren met een "aromatase remmer", de effecten van testosteron deels teniet doet. Een laatste interessante bevinding was het feit dat na behandeling met testosteron de spier die voornamelijk geschikt is voor krachtige bewegingen, de EDL, eigenschappen gaat vertonen die lijken op eigenschappen die meer voorkomen in de spier die voornamelijk gebruikt wordt voor langdurige activiteit, de soleus.

We kunnen de belangrijkste conclusies uit dit proefschrift als volgt samenvatten:

- testosteron heeft een significante invloed op de energiestofwisseling van de spier.
- training heeft een gunstig effect op de defecten in de spierstofwisseling van diabeten ratten.
- de effecten van testosteron zijn verschillend in de verschillende spieren.
- de effecten van testosteron kunnen veroorzaakt worden door de omzetting ervan in oestradiol.

Dit alles wijst erop, dat hyperandrogenisme (teveel testosteron in het bloed) bij vrouwen waarschijnlijk niet primair verantwoordelijk is voor het ontstaan van diabetes mellitus.