



УДК 577.17 + 612.826

ИНТЕНСИВНОСТЬ ПРОЦЕССА КАРБОКСИЛИРОВАНИЯ ПИРУВАТА В МОЗГУ ПРИ ТИРЕОТОКСИКОЗЕ

ЕЩЕНКО И. Д., ВИЛКОВА В. А., ЗАХАРОВА Л. И.

Физиологический институт им. А. А. Ухтомского ЛГУ им. А. А. Жданова, Ленинград

Проведено сравнительное изучение реакции карбоксилирования пирувата в головном мозгу взрослых крыс при тиреотоксикозе. На основании определения активности пируваткарбоксилазы в митохондриальных препаратах, а также на основании результатов экспериментов с ^{214}C -пируватом и ^{314}C -аланином сделано заключение об усилении процесса карбоксилирования пирувата в мозгу животных с тиреотоксикозом. Интенсификация карбоксилирования пирувата осуществляется, главным образом, за счет повышения активности пируваткарбоксилазы, а не NADP-зависимой малатдегидрогеназы.

Исследование процесса новообразования глюкозы и гликогена, а также механизмов его регуляции в головном мозгу представляет несомненный интерес, поскольку мозг обладает ограниченной способностью замены углеводов как основного энергетического источника на другие субстраты окисления, а собственные запасы углеводов в нем весьма незначительны. Особое внимание привлекает выяснение роли тиреоидных гормонов в регуляции этих процессов, так как в настоящее время установлено, что тироксин и 3, 3', 5-трийодтиронин непосредственно участвуют в контроле над интенсивностью энергетического обмена в животном организме [1, 2].

Реакции карбоксилирования пирувиноградной кислоты служат альтернативными путями ввода окисляемых метаболитов в цикл трикарбоновых кислот и наряду с этим играют важную роль в начальных этапах глюконеогенеза. Основными ферментами, участвующими в реакциях карбоксилирования пирувата в тканях животных, являются пируваткарбоксилаза (КФ 6. 4. 1. 1; ПК), локализованная в матриксе митохондрий [3, 4], и NADP-зависимая малатдегидрогеназа (КФ 1. 1. 1. 40; NADP-МДГ), представленная как цитоплазматической, так и митохондриальной формами фермента [5]. В отличие от необратимой пируваткарбоксилазной реакции реакция, катализируемая NADP-МДГ, обратима в физиологических условиях. Однако преимущественное направление ее в митохондриальном и цитоплазматическом

компартаментах, а также скорость реакции в прямом и обратном направлениях неодинаковы [6, 7].

Роль тиреоидных гормонов в регуляции отдельных сторон метаболизма в мозгу взрослых животных остается во многом неясной. Поэтому, целью настоящей работы было определение интенсивности процессов карбоксилирования пирувата в больших полушариях головного мозга крыс при экспериментальном тиреотоксикозе.

Материалы и методы

Опыты проводили на белых крысах-самцах массой 100—120 г. Тяжелую форму тиреотоксикоза вызывали подкожным введением L-тироксина («Reanal») в дозе 400 мкг/100 г массы животного ежедневно в течение 2 недель.

Для оценки интенсивности процессов карбоксилирования пирувата в головном мозгу *in vivo* использовали комплексный подход. Результаты определения активности пируваткарбоксилазы и NADP-МДГ в изолированных субклеточных фракциях мозга сопоставляли с результатами экспериментов с радиоактивными предшественниками— ^{214}C -пируватом и ^{314}C -аланином. О карбоксилировании пирувата судили по изменению содержания в мозгу компонентов реакций: пирувата, оксалоацетата и малата, а также по величинам удельной (УР) и относительной удельной (ОУР) радиоактивности этих метаболитов.

Активность пируваткарбоксилазы определяли в митохондриях, выделенных в сахарозной среде (0,25 М сахараза, 0,01 М трис- HCl буфер и 0,001 М ЭДТА, pH 7,4) с помощью радиоизотопного метода Ballard, Hanson [8]. Анализ активности NADP-МДГ проводили в субклеточных фракциях мозга по методу Brdiczka, Pette [9] в модификации Цончевой [10].

Содержание и радиоактивность субстратов исследовали в головном мозгу животных, замороженных в жидком азоте. Количество пирувата определяли по методу Lamprecht, Czok [11], оксалоацетата—по методу Kalnitsky, Tapley [12], малата—по методу Hohorst [13].

Препараты ^{214}C -пирувата, ^{314}C -аланина вводили подкожно из расчета 30 мК_и/100 г массы животного (в 0,5 мл изотонического физиологического раствора) за 30 мин до забоя. Радиоактивность пирувата, малата, оксалоацетата, а также цитрата определяли на сцинтилляционном счетчике «Delta» (Tracor) после выделения метаболитов из мозга с помощью ТСХ на силикагеле по методу Whereat и соавт. [14].

Результаты и обсуждение

В головном мозгу взрослых животных карбоксилирование пирувата значительно уступает его окислительному декарбоксилированию в пируватдегидрогеназной реакции. Наглядное представление о соотношении процессов карбоксилирования и декарбоксилирования пирувата дают результаты экспериментов с радиоактивными предшественни-

ками, приведенные на рисунке. Сравнение величины ОУР цитрата с ОУР оксалоацетата в опытах с ^{214}C -пируватом показало, что интенсивность процессов карбоксилирования пирувата в мозгу значительно ниже, чем в печени. Особенно четко эти различия проявляются при более коротком сроке радиоактивной экспозиции. Так, в головном мозгу через 15 мин после введения животному радиоактивного предшественника ОУР цитрата превышала ОУР оксалоацетата в 3,2 раза, через 30 мин—в 1,3, что свидетельствует о более интенсивном использовании ^{214}C -пирувата в реакции окислительного декарбоксилирования, чем в реакции карбоксилирования с образованием оксалоацетата. Напротив, в печени величины ОУР цитрата были ниже, чем ОУР оксалоацетата: в 2,4 раза через 15 мин и в 1,9—через 30 мин после введения радиоактивного предшественника. Эти различия свидетельствуют о преобладании в печени процесса карбоксилирования пирувата.

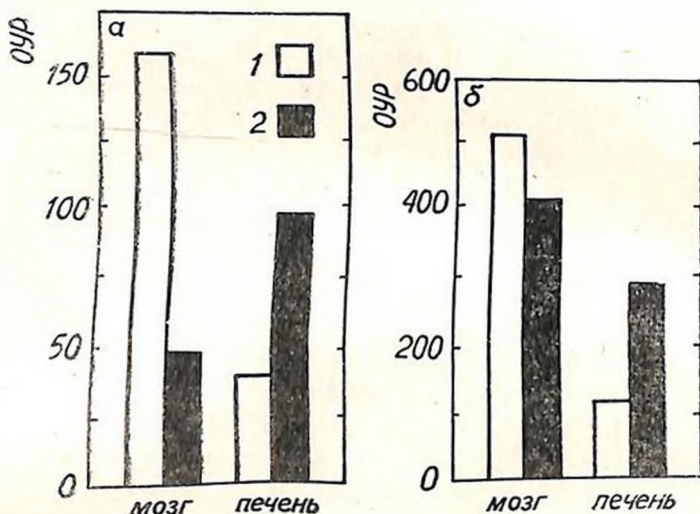


Рис. Сравнение величины ОУР цитрата (1) и оксалоацетата (2) в тканях нормальных животных через 15 (а) или 30 (б) мин после введения ^{214}C -пирувата

Резкие нарушения различных сторон метаболизма при тиреотоксикозе, прежде всего—интенсификация энергетического обмена, дают основания полагать, что под влиянием тироксина возможно изменение соотношения путей метаболизма пирувата. Косвенным доказательством усиления реакций карбоксилирования пирувата в мозгу взрослых животных при тиреотоксикозе служат полученные ранее данные об интенсивности глюконеогенеза в мозгу. Показано, что под действием высоких доз тироксина в мозгу крыс возрастала интенсивность обновления глюкозы и гликогена в экспериментах не только с подкожным, но и с внутримышечным введением радиоактивных предшественников [15].

Непосредственное определение активности ферментов, ответственных за карбоксилирование пирувата в мозгу, подтверждает высказанное предположение (табл. 1). Из приведенных результатов видно, что активность пируваткарбоксилазы увеличивалась в митохондриях мозга при тиреотоксикозе в среднем в 1,5 раза. Активность митохондриальной формы NADP-МДГ практически не изменялась, а цитоплазматической формы возрастала на 30—35% после введения животным тироксина.

Таблица 1

Активность пируваткарбоксилазы и NADP-зависимой малатдегидрогеназы в мозгу в норме и при тиреотоксикозе (нмоль/мин/г ткани)

Ферменты	Контроль	Тиреотоксикоз
Пируваткарбоксилаза (митохондрии)	28,2±1,9	42,8±3,6 p<0,01
NADP-зависимая малатдегидрогеназа:		
митохондриальная	73,1±12,3	65,2±3,7 p>0,05
цитоплазматическая	293±23	392±22 p<0,01

При оценке относительной роли каждого из двух ферментов в карбоксилировании пирувата необходимо учитывать, что направление NADP-МДГ реакции в митохондриальном и цитоплазматическом компартментах неодинаково. Установлено [7], что в митохондриях осуществляется преимущественно карбоксилирование пирувиноградной кислоты с конечным образованием окислительное декарбоксилирование малата.

Пируваткарбоксилазная реакция может быть одним из лимитирующих этапов глюконеогенеза, что подтверждается данными Weinberg, Utter [16], а также Böllger и соавт. [3], полученными в экспериментах на печени. Эти авторы показали, что метаболизм пирувиноградной кислоты может регулироваться изменением внутриклеточного уровня пируваткарбоксилазы, при этом повышение активности фермента связано с увеличением скорости его синтеза при возрастании количества тиреоидных гормонов в организме.

При тяжелом тиреотоксикозе в головном мозгу интенсивность реакций карбоксилирования повышается, о чем свидетельствуют и результаты опытов с применением радиоактивных предшественников (табл. 2). При введении высоких доз тироксина содержание пирувата и оксалоацетата в больших полушариях головного мозга крыс возрастало в 1,7 раза, в то же время количество малата изменялось незначительно—с 0,366 до 0,413 мкмоль/г ткани (на 13%). Величина ОУР оксалоацетата при использовании радиоактивного пирувата в качестве предшественника возрастала при тиреотоксикозе на 39% по срав-

нению с контролем. Таким образом, эти данные позволяют предположить, что в условиях тяжелого тиреотоксикоза усиливается пируваткарбоксилазная реакция.

Таблица 2

Изменение интенсивности пируваткарбоксилазной реакции в головном мозгу при тиреотоксикозе

Показатели	Контроль	Тиреотоксикоз
Содержание компонентов реакции: пируват (мкмоль/ 1 г ткани)	$0,139 \pm 0,011$	$0,235 \pm 0,014$ $p < 0,01$
оксалоацетат (нмоль/ 1 г ткани)	$6,30 \pm 0,21$	$10,92 \pm 0,24$ $p < 0,01$
ОУР оксалоацетата Радиоактивный предшественник: 2^{14}C -пируват 3^{14}C -аланин	407 162	567 176

Примечание. $\text{ОУР} = \frac{\text{УР оксалоацетата (имп/мин/г ткани)} \times 100}{\text{УР предшественника (имп/мин/г ткани)}}$

На основании сопоставления активностей ферментов, а также результатов исследований с использованием радиоактивных предшественников можно заключить, что под влиянием тироксина основные изменения связаны именно с пируваткарбоксилазой, а не NADP-МДГ реакцией. В то же время, как было установлено ранее [17], скорость реакции карбоксилирования как у контрольных, так и у тиреотоксикозных животных значительно уступает скорости окислительного декарбоксилирования пирувата, то есть, несмотря на повышение интенсивности пируваткарбоксилазной реакции в митохондриях больших полушарий головного мозга, доминирующим путем обмена пирувата является пируватдегидрогеназная реакция.

INTENSIVITY OF PYRUVATE CARBOXYLATION IN BRAIN UNDER THYREOTOXICOSIS

ESHCHENKO N. D., VILKOVA V. A., ZAKHAROVA L. I.

A. A. Ukhtomsky Institute of Physiology, Leningrad State University

The comparative studies of the reactions of pyruvate carboxylation have been made on adult brain of rats suffering from thyreotoxycosis. Based on: 1) the activity of pyruvate carboxylase in brain mitochondria and. 2) the results of experiments with 2^{14}C -alanine, was made a conclusion about the increase of pyruvate carboxylation in brain of thyreotoxic rats. One of two enzymes catalyzing pyruvate carboxylation (pyruvate carboxylase and NADP-malate dehydrogenase)—pyruvate carboxylase was mainly responsible for this process under thyreotoxycosis.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Scäfer G., Nagel R.* Biochem. et biophys. acta, 162, 4, 617—620, 1968.
2. *Голубев А. Г., Ещенко Н. Д.* Вестн. ЛГУ, 15, 66—74, 1977.
3. *Böttger I., Wieland O.* Eur. J. Biochem., 8, 113—119, 1969.
4. *Aprille J. R., Yasween P., Rulfs J.* Biochem. et biophys. acta, 675, 1, 143—147, 1981.
5. *Patel M. S. J.* Neurochem., 22, 5, 712—724, 1974.
6. *Frenkel R. J.* Biol. Chem., 246, 17, 5569—5572, 1972.
7. *Terumi S., Kenkichi T. J.* Biochem., 73, 4, 803—810, 1973.
8. *Ballard E. J., Hanson R. W. J.* Lipid Res., 8, 2, 73, 1967.
9. *Brdiczka D., Pette D.* Eur. J. Biochem., 19, 4, 546—552, 1971.
10. *Цончева Л. В.* Биохимия, 39, 6, 1172—1178, 1974.
11. *Lamprecht W., Czok R.*—In: Methoden der enzymatischen analyse, p. 1407—1411, Berlin, Bd. 2, 1970.
12. *Kalnitsky G., Tapley D. T.* Biochem. J., 28, 1, 28—34, 1958.
13. *Hchorst H. U.*—In: Methods of enzymatic analysis. Ed. by H. U. Bergmeyer, p. 328—332, N. Y., Acad. Press, 1965.
14. *Whereat A. F., Snyderman D. R., Barness L. A. J.* Chromatogr., 36, 390—393, 1968.
15. *Вилкова В. А., Ещенко Н. Д.* Проблемы биохимии (Нервная система), 19, с. 157—168, Изд-во ЛГУ, 1978.
16. *Weinberg M. B., Utter M. F. J.* Biol. Chem., 254, 19, 9492—9499, 1979.
17. *Ещенко Н. Д., Путилина Ф. Е., Вилкова В. А.*—В кн.: Митохондрии, с. 27—32, М., Наука, 1977.

Поступила 15. VIII 1983