Instituto di Farmacologia dell'Università di Milano
Milano (Italia)

Effetto del trattamento con tirossina su alcuni sistemi enzimatici B₆-dipendenti

di

N. Canal e A. Maffei-Faccioli

I rapporti tra ormone tiroideo e vit. B₆, ricerche non più recenti riducevano ad un semplice antagonismo (1), devono essere inquadrati in uno schema molto più complesso se analizzati in modo più dettagliato sul piano biochimico. Se infatti è logico supporre che il deficit delle «fosforilazioni», caratteristico dello stato ipertiroideo, si ripercuote anche sulla formazione della vitamina B₆ dal piridossal-5-fosfato (Py-5-P) bisogna d'altra parte considerare che l'accumulo di vari metaboliti, espressione di blocchi metabolici diversi, pure osservato nell'ipertiroidismo, può, con meccanismi indipendenti, quale ad esempio quello dell'induzione enzimatica adattativa, condizionare un aumento di taluni enzimi che, per avere il piridossal-5-fosfato come coenzima, era logico attendersi diminuiti. Ricordiamo inoltre che il legame apoenzima-coenzima può essere per taluni sistemi enzimatici così stretto da impedire una diminuzione di attività del sistema in parola anche per effetto di regimi carenziali prolungati.

Appare quindi evidente, per le ragioni sopra esposte, che un'idea esatta dei rapporti tra tiroide e vitamina B₆ potrà essere raggiunta solo indagando in condizioni di turbata funzionalità tiroidea come variano le numerose attività enzimatiche piridossal-dipendenti.

* Comunicación 4-7 a las V Jornadas Bioquímicas Latinas. Barcelona, mayo 1959.

Riferiamo nel presente lavoro i dati riguardanti il dosaggio nel ratto trattato con forti dosi di tirossina, dei seguenti enzimi piridossal-dipendenti: le transaminasi glutammico-ossalacetico e glutammico-piruvico, le decarbossilasi dell'ac. cisteico, dell'ac. glutammico e del 5-OH-triptofano. Parte dei risultati che riportiamo sono stati oggetto di comunicazioni preliminari (2) (3).

Materiale e metodi

Abbiamo usato ratti albi maschi provenienti dal nostro allevamento, del peso medio di 120-150 g. L'ipertiroidismo era indotto mediante iniezione sottocutanea di 1 mg pro ratto e pro die di dl-tirossina (Roche) per un periodo variabile dai 25 ai 35 giorni. Durante questo tempo i ratti venivano alimentati con una dieta contenente il 20 % di proteine, somministrata loro «ad libitum». L'efficacia del trattamento veniva controllata con la curva ponderale che era più bassa nei controlli, e mediante la registrazione elettrocardiografica della frequenza cardiaca (media controlli: 486/min.; media ipertiroidei: 580/min.).

Alla fine del trattamento a distanza di 24 h dall'ultima iniezione, i ratti, a digiuno da 24 ore, venivano uccisi e dissanguati, gli organi immediatamente prelevati venivano posti in ghiaccio fino al momento dell'uso. Le determinazioni venivano iniziate non oltre 20' dall'uccisione dell'animale.

I metodi impiegati per i dosaggi enzimatici sono stati i seguenti. Per le decarbossilasi degli amino-acidi si è usato il metodo manometrico: secondo ROBERTS (4) per l'ac. glutamico, secondo BLASCHKO (5) per l'acido cisteico. L'attività è espressa in mm³ di CO₂ sviluppato da 100 mg. di tessuto fresco in 1 h. La transaminasi glutammico-ossalacetico è stata dosata secondo la metodica di TONHAZY (6), l'attività è espressa come micromole di ac. ossalacetico formato da 1 mg di tessuto secco in 1 h. La transaminasi glutammico-piruvico è stata dosata secondo COHEN e coll. (7) e l'attività espressa in termini di ac. piruvico transaminato da 1 mg di tessuto secco in 1 ora.

Per la decarbossilasi del 5-OH-triptofano abbiamo usato la tecnica di BUZARD e coll. (8).

L'attività enzimatica è espressa come micromoli di serotonina formata da 100 mg. di tessuto fresco in 2 ore. La 5HT è stata determinata con il metodo spettrofluorimetrico di BODANSKI e coll. (9).

Risultati

Nella tabella n. 1 sono esposti i dati riguardanti i dosaggi della decarbossilasi dei vari aminoacidi. Come si può vedere,

solo la decarbossilasi dell'ac. cisteico è variata nell'animale ipertiroideo rispetto ai controlli, nel senso di una notevole diminuzione. Sia la glutammico-decarbossilasi cerebrale che la 5-OH-triptofano-decarbossilasi cerebrale ed epatica non appaiono invece significativamente variate. L'aggiunta «in vitro» di Py-5-P all'omogenato di fegato pur provocando un netto incremento della decarbossilazione dell'acido cisteico non è in grado di riportare ai valori normali l'attività decarbossilante.

TABELA 1

Trattamento	Decarbossilasi (°) ± E. S.			
	ac. glutammico (cervello)		ac. cisteico (fegato)	
	—	Py-5-P	—	Py-5-P
Controlli	(8)28,6 ± 2,45	(7)97,5 ± 3,90	(6)8,40 ± 0,89	(⁰⁰⁰)—
Tirossina	(8)26,00 ± 2,18	(8)107,8 ± 3,77	(8)1,76 ± 0,69	(8)3,94 ± 0,85

Trattamento	Decarbossilasi (°) ± E. S.			
	5-OH-triptofano (cervello)*		5-OH-triptofano (fegato)	
	—	Py-5-P	—	Py-5-P
Controlli	(7)0,227 ± 0,015	(5)0,316 ± 0,02	(8)3,49 ± 0,25	(8)4,93 ± 0,38
Tirossina	(8)0,210 ± 0,012	(8)0,320 ± 0,025	(8)3,50 ± 0,30	(8)4,85 ± 0,31

(°) Per le unità di misura con cui è espressa l'attività enzimatica vedi: Materiali e Metodi.

(⁰⁰) Tra parentesi il numero dei ratti impiegati.

(⁰⁰⁰) L'aggiunta di Py-5-P non causa un significativo aumento dell'attività enzimatica.

Si può arguire da questi dati che nell'animale ipertiroideo sia la quota enzimatica che quella coenzimatica della cisteico-decarbossilasi sono diminuite. Delle due porzioni è peraltro quella coenzimatica la più gravemente affetta: il coenzima è presente nel fegato dell'animale trattato in quantità insufficienti a saturare l'intera quota apoenzimatica che pure è solo il 50 % circa di quella presente nell'animale normale.

I dati riguardanti le transaminasi sono riportati nella tabella 2. Come si vede la glutammico-piruvico transaminasi epatica e la glutammico-ossalacetico transaminasi cerebrale sono invariate nell'animale ipertiroideo rispetto ai controlli, mentre

la glutammico-ossalacetico-transaminasi epatica e cardiaca appare, nell'animale trattato, nettamente aumentata.

TABELLA 2

Attività transaminasica dei diversi organi di ratti trattati o no con tirossina

Glutammico-piruvico transaminasi (μ M ac. piruvico/mg peso secco/h)			
Organo	Controlli	Trattati	Significativ.
Fegato	(5) (°) $1,04,04 \pm 0,132$	(8) $1,19 \pm 0,089$	N. S.
Glutammico-piruvico transaminasi (μ M ac. ossalacetico/mg peso secco/h)			
Fegato	(15) $10,91 \pm 1,02$	(15) $14,9 \pm 1,96$	P < 0,05
Cuore	(15) $26,36 \pm 1,74$	(15) $33,87 \pm 2,0$	P < 0,05
Cervello	(15) $10,72 \pm 0,72$	(15) $10,27 \pm 0,74$	N. S.

(°) Tra parentesi il numero delle determinazioni.

Discussione

La possibilità di un non univoco comportamento dei vari enzimi B₆-dipendenti in seguito al trattamento con tirossina, da noi prospettato, è sperimentalmente documentato in questo studio.

Delle decarbossilasi studiate solo la cisteico decarbossilasi appare diminuita nell'ipertiroidico. Questo dato è stato recentemente confermato da autori francesi (10) (11), che hanno dimostrato la diminuzione, nel ratto trattato con tirossina, della decarbossilasi dell'ac.cisteinsufinico epatica (*), mentre nessuna variazione è dimostrabile per la glutammico-decarbossilasi cerebrale. La diminuzione sia della quota coenzimatica che di quella apoenzimatica del sistema decarbossilante si può interpretare ammettendo che l'azione della tirossina si espliciti sul coenzima con meccanismo defosforilante e sull'apoenzima con meccanismo proteico-catabolico.

Resta da spiegare la mancata azione a carico delle altre decarbossilasi studiate. Per la glutammico-decarbossilasi, enzima presente prevalentemente nell'encefalo, il dato si può forse inquadrare nella relativa stabilità dimostrata da molti sistemi enzimatici cerebrali, e di cui daremo un ulteriore esempio più oltre a proposito della transaminasi glutammico-ossalacetico, di fronte all'ormone tiroideo (13) (14) (15). Il meccanismo con cui si realizza questa omeostasi cerebrale resta per altro oscuro.

(*) Secondo DAVISON (12) la cisteico-decarbossilasi e la cistein-sulfonico decarbossilasi sarebbero il medesimo enzima.

La mancata influenza dell'ipertiroidismo sulla 5HTP-decarbossilasi, fa supporre che questo sistema enzimatico sia costituito da un complesso apoenzima-coenzima molto difficilmente dissociabile. Questa caratteristica della 5HTP-decarbossilasi era stata del resto già messa in evidenza da altri ricercatori (16) (17). Solo la prolungata carenza di vitamina B₆ (18) o il trattamento con forti dosi di sostanze note per essere attivi inibitori del Py-5-P (19) (20) sono in grado di bloccare l'attività decarbossilante dei tessuti diminuendo la quota coenzimatica. Evidentemente l'ipertiroidismo non realizza condizioni tali da poter influire sullo stretto legame apoenzima-coenzima della 5HTP-decarbossilasi.

Il comportamento delle transaminasi nell'animale ipertiroideo deve essere inquadrato in un diverso ordine di considerazioni. Notiamo anzi tutto che i nostri dati differiscono sostanzialmente da quelli riportati da HORVATH (21). Per questo A. l'iniezione di tirossina provoca una spiccata diminuzione delle transaminasi glutammico-piruvico, mentre la glutammico-ossalacetico transaminasi non mostra variazioni sostanziali. Dobbiamo peraltro osservare che le condizioni sperimentali dell'A. citato sono sostanzialmente diverse dalle nostre: i 10 microg di dl-tirossina per 15 gg. impiegati da HORVATH non erano certamente tali da provocare un ipertiroidismo pieno nel ratto che è un animale relativamente poco sensibile all'ormone tiroideo.

L'aumento della glutammico-ossalacetico transaminasi da noi riscontrato nell'animale ipertiroideo deve essere probabilmente ascritto ad un fenomeno di «adattabilità enzimatica». Esistono ormai molti dati sperimentali per poter affermare che la trasaminasi glutammico-ossalacetico è sensibile agli stimoli di tipo adattativo. Essa è aumentata in varie condizioni, come il trattamento con cortisonici (22) (23), diabete da allossana (24), scorbuto (25) in sui è stato dimostrato un aumento di substrati trasaminabili: alfa-chetoacidi o aminoacidi. E' documentato pure il suo aumento nel ratto sottoposto a regime iperproteico (26). Nell'ambito dei fenomeni adattativi si devono verosimilmente inquadrare anche gli stretti rapporti intercorrenti, secondo alcuni AA. (*) tra trasaminazioni e catabolismo proteico (28) (29) (30) (31) (32).

Nell'ipertiroidismo si avverano appunto quelle condizioni di aumento di substrati trasaminabili (33) (34) e di catabolismo proteico che potrebbero condizionare un aumento adattativo dell'enzima. Resta peraltro non facilmente comprensibile la

(*) Ricordiamo che secondo CEDRANGOLO (27) non si può sostenere un rapporto evidente tra trasaminazioni e biosintesi proteiche.

mancata variazione, nelle nostre condizioni, della transaminasi glutammico-piruvico che di solito è, delle due transaminasi, quella più soggetta a variare per stimoli vari (32) (35).

Conclusioni

I dati da noi riferiti dimostrano che i rapporti tra ormone tiroideo e vitamina B₆ non si possono ridurre ad un semplice antagonismo. Un rapporto di questo tipo noi abbiamo potuto mettere in evidenza solo per la cisteico-decarbossilasi nella cui diminuzione la tirossina gioca probabilmente con duplice meccanismo: defosforilante sul coenzima e proteico-catabolico sull'apoenzima. Per la glutammico-ossalacetico trasaminasi epatica e cardiaca questi due meccanismi hanno importanza minore e non sono tali da bilanciare l'induzione adattativa dell'enzima condizionata dalla situazione metabolica instauratasi con l'ipertiroidismo.

Questo sta a testimoniare della pluralità di elementi che in questa sindrome complessa entrano in gioco ad influenzare, con meccanismi spesso diretti in senso opposto, tappe metaboliche diverse.

Summary

Effect of thyroxine treatment on some B₆-depending enzymatic systems

The well known antagonism between tyroxin and vit. B₆ has prompted the AA. to study the effect of a treatment with thyroid hormon on some enzymes having pyridoxal-5-phosphate as cofactor. From a strictly biochemical point of view the antagonism tyroxin-B₆ is not always easily demonstrable: after a treatment with tyroxin the liver glutamic-pyruvic transaminase is unchanged while the glutamic-oxalacetic transaminase in liver heart is augmented. After the same treatment, brain glutamic decarboxylase and liver and brain 5-OH-tryptophan decarboxylase are unchanged, while liver cysteic acid decarboxylase is strongly impaired. Cysteic decarboxylase is only partially restored by «in vitro» addition of pyridoxal-5-phosphate: thus both apoenzyme and coenzyme are affected by thyroxin treatment.

Coenzyme dephosphorylation, protein catabolism and adaptativ phenomena are taken into account in order to explain the different behaviour of the B₆-dependent enzymes.

Bibliografia

- (1) DRILL, V. A., e OVERMAN, R. : *Amer. J. Physiol.*, **135**, 474, 1942.
- (2) CANAL, N., TESSARI, L. : *Boll. Soc. It. Biol. Sper.* **33**, 1472, 1957.
- (3) CANAL, N., CLEMENTI, M. S., MAFFEI-FACCIOLI, A. : *Boll. Soc. It. Biol. Sper.*, **34**, 789, 1958.
- (4) ROBERTS, E., e coll. : *J. Biol. Chem.*, **191**, 277, 1951.
- (5) BLASCHKO, A. H. : *Biochem. J.*, **36**, 277, 1942.
- (6) TONHAZY, N. E., WHITE, N. G., UMBREIT, W. W. : *Arch. Biochem.*, **38**, 36, 1950.
- (7) COHEN, P. P., HEKHUIS, G. L. : *J. Biol. Chem.*, **140**, 711, 1941.
- (8) BUZARD, J. A., NYTCH, P. D. : *J. Biol. Chem.*, **227**, 225, 1957.
- (9) BOGDANSKI, D. F., PLETSCHER, A., BRODIE, B. B., UDENFRIEND, S. : *J. Pharm. Exp. Ther.*, **117**, 83, 1956.
- (10) CHATAGNER, F., BERGERET, B., LABOUESSE, J. : *Biochim. Biophys. Acta*, **30**, 422, 1958.
- (11) BERGERTT, B., LABOUESSE, J., CHATAGNER, F. : *C. R. Soc. Chim. Biol.*, **40**, 1923, 1958.
- (12) DAVISON, A. N. : *Biochim. Biophys. Acta*, **19**, 66, 1956.
- (13) SCHEINBERG, P. : *J. Clin. Invest.* **29**, 1010, 1950.
- (14) SMITH, R., WILLIAMS-ASHMAN, H. G. : *Biochim. Biophys. Acta*, **7**, 295, 1951.
- (15) BARKER, S. B., KLITGAARD, H. M. : *Amer. J. Physiol.*, **170**, 81, 1952.
- (16) CLARK, C. T., WEISSBACH, H., UDENFRIEND, S. : *J. Biol. Chem.*, **210**, 139, 1954.
- (17) BEILER, J. M., MARTIN, G. J. : *J. Biol. Chem.*, **211**, 39, 1954.
- (18) BUXTON, J., SINCLAIR, H. M. : *Biochem. J.*, **62**, 27P, 1956.
- (19) WEISSBACH, H., BOGDANSKI, D. F., REDFIELD, B. G., UDENFRIEND, S. : *J. Biol. Chem.*, **227**, 617, 1957.
- (20) CANAL, N., MAFFEI-FACCIOLI, A. : *Comunicazione alle 1° Jornadas Bioquimicas Latinas*, Barcelona, maggio, 1959.
- (21) HORVATH, A. : *Nature*, **179**, 968, 1957.
- (22) RINDI, G. : *Arch. Sci. Biol.*, **38**, 155, 1954.
- (23) GAVOSTO, F., PILERI, A., BRUSCA, A. : *Biochim. Biophys. Acta*, **24**, 250, 1957.
- (24) BARBIERI, E. : *Experientia*, **13**, 156, 1957.
- (25) BARBIERI, E. : *Riv. Biol.*, **49**, 141, 1957.
- (26) BOREL, C. C., RYSER, H., FREI, J. : *Helv. Physiol. Pharm. Acta*, **15**, C12, 1957.
- (27) CEDRANGOLO, F. : *Le transaminazioni. Giornale Biochimiche Italo-franco-elvetiche*. Ed. C.N.R., Roma, 1954.
- (28) COHEN, P. P., HEKHUIS, G. L. : *Cancer Res.*, **1**, 620, 1954.

- (29) BEATON, G. H., OZAWA, G. R., BEATON, J. R., MCHENRY, E. W. : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **83**, 781, 1953
- (30) CALDWELL, E. F., MCHENRY, E. W. : *Arch. Biochem.*, **45**, 397, 1953.
- (31) BARLETT, P. D. GLYNN, M. : *J. Biol. Chem.*, **187**, 253, 1950.
- (32) BEATON, G. H., CURRY, D. M., VEEN, M. J. : *Arch. Biochem. Biophys.*, **70**, 288, 1957.
- (33) MORUZZI, G., e coll. : *Boll. Soc. It. Biol. Sper.*, **22**, 1143, 1946.
- (34) BARBERI, E. : *Boll. Soc. It. Biol. Sper.*, **33**, 472, 1957.
- (35) ROSEN, F., ROBERTS, N. R., NICHOL, CH. A. : *J. Biol. Chem.*, **234**, 476, 1959.