

1532

A

Н. К. ЛУКАШИК

**ОТНОШЕНИЕ ТИАМИНА
К НАЧАЛЬНЫМ РЕАКЦИЯМ
УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА**

г. Гродно. 1964 г.

Работа выполнена на кафедре биохимии Гродненского Государственного медицинского института (ректор — доцент Д. А. МАСЛАКОВ).

Научный руководитель — кандидат медицинских наук, доцент Ю. М. Островский.

В работе 220 страниц машинописи, куда входят 19 графиков и 38 таблиц.

В списке литературы приведены 223 работы отечественных авторов и 365 работ иностранных авторов.

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

Доктор медицинских наук, профессор

Розанов А. Я.

Кандидат биологических наук, доцент

Малаховский А. И.

Диссертация обсуждалась в лаборатории биохимии отдела экспериментальной терапии Онкологического института АН ЛССР.

Автореферат разослан 20 мая

Защита состоится 24 июня 1965 года

К настоящему времени благодаря усилиям отечественных и зарубежных исследователей установлены основные пути обмена углеводов в организме животных и человека. Выделены и очищены многие ферменты, участвующие в превращении углеводов, выяснено значение этого вида обмена для жизнедеятельности организма.

Интенсивно изучается регуляция углеводного обмена. Исследования последних лет приближают к пониманию механизмов действия ряда гормональных факторов (инсулина, адреналина, глюкагона и др.) в метаболизме углеводов. Привлекает интерес изучение участия в углеводном обмене витаминов, в частности, тиамина.

Обзор литературы состоит из двух частей. В первой части приводятся современные представления о превращении углеводов в организме животных и человека по гликолитическому и пентозофосфатному пути. Обобщаются исследования последних 5—7 лет об обмене фруктозы, синтезе и расщеплении гликогена. Кратко излагаются сведения о нарушении углеводного обмена при сахарном диабете у людей и при экспериментальном аллоксановом диабете у животных, указывается на некоторые другие случаи патологии углеводного обмена.

Во второй части обзора литературы изложены представления об участии тиамина в обмене углеводов. Приводятся реакции, в которых витамин в виде ТДФ выполняет каталитическую функцию: простое и окислительное декарбоксилирование альфа-кетокислот, образование ацетона, транскетотазная реакция. Излагается механизм каталитического действия ТДФ. Кратко освещается вопрос об образовании и распределении тиаминфосфатов в тканях. Цитируются исследо-

Принятые сокращения: ТМФ, ТДФ, ТТФ — соответственно тиамин моно-, -ди- и -три-фосфаты, АТФ — аденозинтрифосфат, гл-1-ф — глюкозо-1-фосфат.

вания по изучению углеводного обмена при В₁ — авитаминозе, фиксируется внимание на нарушениях углеводного обмена.

Данные литературы, имеющие наиболее прямое отношение к изучаемому вопросу, кратко сводятся к следующему. У В₁ — авитаминозных голубей уменьшено содержание гликогена в печени и мышцах, угнетен гликогенолиз, в тканях накапливаются пировиноградная и молочная кислоты, понижается всасываемость глюкозы в кишечнике (Бикл, 1926; Яновская Б. И., 1931; Петерс и сотр., 1937; Хопер, 1942). У животных, получавших меченую глюкозу, недостаточность тиамина уже на 10-й день снижает включение радиоактивного углерода в гликоген, жирные кислоты и выдыхаемый СО₂ (Винер, Стейн-Паве, 1959). Изменения в обмене альфа-кетоглутаровой кислоты наблюдаются наиболее резко только в печени, в других тканях декарбоксилирование этой кетокислоты очень долго не нарушается и лишь в терминальном периоде В₁ — авитаминоза ослабляется (Сопин Е. Ф., 1957, 1958).

Приводятся данные о возможности развития В₁ — гиповитаминоза при некоторых заболеваниях (Капланский С. Я. и др., 1947; Тунк, Уэлбон, 1953; Ревунова Е. Н., 1958; и т. д.), после назначения медикаментозного лечения (Островский Ю. М., 1958; Нузберг Л. И., 1960; Моторина В. В., 1962).

Тиамин, а в последнее время ТДФ (кокарбоксилаза) получили широкое применение в клинической практике (сахарный диабет, невриты, рассеянный склероз). Только в единичных исследованиях не отмечено влияние тиамина на углеводный обмен (Кох, 1950; Гамбесси, Маджи, 1953; и др.). В подавляющем большинстве работ показано, что применение тиамина и, особенно, ТДФ у больных сахарным диабетом отчетливо снижает сахар крови (Можонди, Асцоди, 1938; Тразов, Бардин, 1941; Боулин, 1952; Новицкая З. В., 1950; Ашмонайте М. Н., Малаховский А. И., 1958 и др.). Назначение витамина совместно с инсулином приводит к усилению гипогликемического действия гормона (Мартин, 1937; Баулин, 1951; Пеккер Ф. С., 1950; Рысс С. М., 1963). Понижение гликемии после применения тиамина отмечено у здоровых

интактных животных (Тисловиц, 1937; Лиотта, 1939; Смыслова Г. И., 1951). В изолированных системах усиливается гликолиз при добавлении тиамин в инкубационную среду (Захарова В. А., 1952, 1959; Махида, 1958; Гиммерих Ф. И., 1960).

Попытки объяснить указанные эффекты тиамина в углеводном обмене якобы имеющимся эндогенным гиповитаминозом или активацией соответствующих ферментов, содержащих ТДФ, не всегда убедительны. Так, даже при сахарном диабете содержание тиамина в тканях иногда не уменьшено (Нилин и др. 1940), а процессы фосфорилирования тиамина не нарушены (Винсент, 1957; Маркен-Лихтенбелт, Флориан, 1955). Ряд исследований проведено на объектах с предварительно исключенным эндогенным В₁ — гиповитаминозом (Мейтина Р. А., 1948).

С известными коферментными функциями тиамина невозможно связать накопление гликогена в тканях и замедление процессов его распада при избыточном поступлении тиамина в организм (Стейгервальдт, 1939; Волинский З. М., 1949; Бусила, Дарагон, 1948; Вейс, Ривай, 1960). Для объяснения изложенных фактов высказывалось предположение о возможном участии тиамина в начальных стадиях превращения гексоз (Маркиз, 1952; Островский Ю. М., 1960; Фьюм, 1960). Но детальных исследований в этом направлении пока нет. Возможную роль тиамина в регуляции начальных этапов гликолиза мы попытались изучить, исследуя начальные и некоторые промежуточные ферментные реакции гликолиза, которые по современным представлениям с функциями тиамина пока не связывают. Выбор конкретных ферментов сделан на основании различных косвенных данных, подробно приводимых нами в соответствующих разделах.

Все исследование проводилось по трем основным направлениям:

1. Определение активности ферментов гликолиза (альдолаза мышц и сердца, фосфоорилаза печени и мышц, амилаза мозга и поджелудочной железы) у животных с различной обеспеченностью организма тиамином;

2. Изучение активности гликолиза в изолированных системах (срезы, гомогенаты, эритроциты, изолированная диафрагма) в присутствии тиаминa.

3. Определение активности очищенных ферментов углеводного обмена (фосфорилаза, амилаза, гексокиназа, альдолаза) в присутствии тиаминa или его производных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Голуби с различной обеспеченностью организма тиаминoм:

1. Птиц содержали на стандартном рисовом рационе, предварительно обработанном для разрушения тиаминa. Авитаминозная группа птиц получала только рис. С целью ускорения развития авитаминоза в пищу добавлялся тканевой сок двухстворчатых пресноводных моллюсков, содержащий тиаминазу. С 8—10 дня применялось насильственное кормление голубей, а на 15—20 день появлялись первые признаки витаминной недостаточности. Птицы условной нормы получали ту же пищу и дополнительно по 10 мкг тиаминa на птицу в день. Третья группа (гипервитаминоз) ежедневно в течение 30—40 дней получала на каждую птицу с пищей 100—200 мкг тиаминa.

Содержание этих трех групп голубей на рисовом рационе было неудачным в отношении обеспеченности организма птиц полноценным питанием. Но сравниваемые группы отличались только по обеспеченности тиаминoм. Содержание ТДФ в мкг/г сырого веса печени составляло соответственно для 1,2 и 3 групп — 1,23; 6,16 и 12,44, что соответствует литературным данным относительно В₁ — авитаминоза и указывает на близость второй группы к норме.

2. У голубей вызывался гипервитаминоз — В₁ введением тиаминa в инъекциях в дозе 1 мг на птицу в течение месяца. Контрольной группе ежедневно вводили стерильный изотонический раствор NaCl.

3. Острый окситиаминовый авитаминоз у голубей вызывался введением 40 мг окситиаминa на 100 г. веса. Препарат вводили утром и вечером накануне опыта. Через 24 часа от начала введения окситиаминa у большинства птиц развива-

лась картина, характерная для В₁ — авитаминоза (шаткая походка, в отдельных случаях опистотонус). У опытных птиц в крови накапливалась пировиноградная кислота (контроль — 1,51, авитаминоз 4.60 мг%, $p < 0,001$), понижалась активность транскетолазы эритроцитов (контроль — 2.28×10^{-3} , авитаминоз — 1.33×10^{-3} мк моль седогептулозы /час/млн. эритроцитов; $p < 0,01$). Перед убоем птицы голодали 10—12 часов. После декапитации из органов (печень, сердце, мышцы, мозг) при температуре 0°C приготавливали гомогенаты. Ферментную активность в гомогенатах определяли немедленно.

Аллоксановый диабет у крыс, весом 180—200 г., вызывался однократным подкожным введением 5% свежеприготовленного водного раствора аллоксана из расчета 15 мг/100 г. веса. Животные содержались на обычном пищевом рационе. На 24—26 день после введения препарата (сахар крови больше 250 мг%) животных убивали. Из органов (сердце, печень, мозг) приготавливали срезы и инкубировали в сосудах аппарата Варбурга (среда — раствор Тирода для теплокровных) в присутствии тиамин (1.10⁻⁵—2.10⁻⁶м) в течение двух часов при 37°C. В контрольных опытах ткани инкубировались без витамина. Манометрически определяли потребление кислорода в ходе инкубации и в конце опыта — убыль глюкозы. Параллельно проводились опыты в аналогичных условиях с тканями интактных крыс. В опытах использовались также интактные кролики, весом 1700—2500 г, у которых после внутривенного введения тиамин или тиаминфосфатов (ТМФ, ТДФ) из расчета 10 мг/кг веса определялась активность транскетолазы эритроцитов и уровень сахара крови.

Выделение ферментов и определение их активности.

Альфа-амилаза выделена из слюны человека по методу Барифельда (1956). В опытах применяли свежеприготовленное разведение фермента 1:5000 на 0.2 м фосфатном буфере, РН-7. Опытная смесь инкубировалась 10 мин. при 37°C, реакция прекращалась добавлением равного объема 10% сульфосалициловой кислоты. На фотоэлектроколориметре при длине волны 680 мкм измерялась оптическая плотность иодкрахмального комплекса, образующегося при взаимодей-

ствии нерасщепленного субстрата (крахмала) с 0,01 м раствором иода.

Активность фермента выражалась в процентах убыли экстинции за время инкубации. По аналогичной методике определялась амилолитическая активность в гомогенатах тканей.

Фосфорилаза из мышц выделена по методу Петровой А. Н. и сотр. (1949). Активность фермента определяли по убыли неорганического фосфата из инкубационной среды при расщеплении гликогена и по прибыли его в случае синтеза полисахарида из гл-1-ф.

Обогащенный препарат гексокиназы из мышц и сердца кролика выделяли по методу Стейна и сотр. (1950). Белок растворяли в 0,1 м вероналовом буфере, pH 7,4, разливали в отдельные флаконы и сохраняли в замороженном состоянии при температуре — 6°C. В инкубационной среде содержались следующие компоненты: глюкоза — 0,0015 М, $MgCl_2$ — 0,005 М, K_2J — 0,05 М, АТФ — 0,005 М, фосфатный буфер 0,035 М, pH 7,8. Активность определяли по методу Лонга (1952) и выражали в мк молях глюкозы на мг белка фермента.

Альдолаза выделена в кристаллическом состоянии из мышц кролика по методу Тейлора и сотр. (1948). Активность фермента определялась по способу Брунса в модификации Товарицкого В. И. и Валуysкой Е. Н.

Активность фермента выражалась в условных единицах на мг ткани (белка).

Транскетолазу эритроцитов определяли по методу Брунса и сотр. (1958) и выражали в мк молях седогептулозы /час/ млрд эритроцитов. Сахар в крови определяли по Хедгорну-Иенсену, гликоген в тканях — по Кремеру в модификации Фонга и сотр. (1953), неорганический фосфор — по Фиске и Субарроу с аскорбиновой кислотой, белок в гомогенатах, центрифугатах и ферментных препаратах — с реактивом Горнала.

Хроматографически чистые фосфорные эфиры тиаминна тиаминтрифосфат — гидрат, тиаминдифосфат — тетрагидрат,

тиаминдифосфат-хлоргидрат, тиаминмонофосфат-фосфат получены из лаборатории синтеза коферментов Всесоюзного научно-исследовательского витаминного института, г. Москва (Березовский В. М.). Тиамин-основание получен из тиаминхлорида с использованием ионообменников (ЭДА-10П). Тиохром получен из дисульфида тиамина по методу Сайкса и Тодда (1951), окситиамин по Ридону (1951). Применялись следующие коммерческие препараты: гл-1-ф, гл-6-ф, фр-1-6-диф, рибозо-5-ф, гликоген, пиритиамин-гидробромид.

Полученные результаты обработаны статистически общепринятыми методами.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние тиамина на некоторые показатели обмена углеводов в организме.

У трех групп голубей (авитаминозная, нормальная и гипervитаминозная), которые находились в одинаковых условиях и получали с пищей различное количество тиамина, исследовали альдолазную активность гомогенатов мышц, сердца и сыворотки крови. Результаты этих опытов представлены в таблице 1.

Таблица 1.

ИЗМЕНЕНИЕ ФЕРМЕНТНОЙ АКТИВНОСТИ В ТКАНЯХ ГОЛУБЕЙ, ПОЛУЧАВШИХ ТИАМИН С ПИЩЕЙ

Активность фермента в услов. ед./мг. ткани или мл. сыворотки	Авитаминоз	Норма	Гипервитаминоз
Альдолаза мышц	625	822	926
	$p < 0,01$		$p = 0,05$
Альдолаза мышцы сердца	81	88	102
	$p > 0,2$		$p < 0,02$
Альдолаза сыворотки крови	71,4	55	73,8
	$p < 0,02$		$p < 0,01$

Обнаружено понижение активности альдолазы мышц у В₁ — авитаминозных и повышение ее у гипервитаминозных птиц по сравнению с контрольными. В сердце при авитаминозе не наблюдается заметного изменения активности альдолазы, но гипервитаминоз сопровождается отчетливым повышением ее. Активность фермента в сыворотке крови повышается у авитаминозных и гипервитаминозных птиц.

Чтобы исключить влияние различий во всасываемости витамина из кишечника у различных групп голубей, в следующей серии опытов (норма и В₁ — гипервитаминоз) тиамин вводился в инъекциях (1 мг на птицу в день). Результаты приведены в таблице 2.

Таблица 2

ИЗМЕНЕНИЕ ФЕРМЕНТНОЙ АКТИВНОСТИ В ТКАНЯХ ГОЛУБЕЙ, ПОЛУЧАВШИХ ТИАМИН ИЛИ ОКСИТИАМИН В ИНЪЕКЦИЯХ

	Норма	Гипервита- миноз	Авитаминоз окситиами- новый	Норма
Альдолаза мышц	810 $p < 0,05$	880	68,1 $p < 0,05$	87,5
Альдолаза сердца	69 $p = 0,5$	71,5	13,4 $p < 0,02$	17,1
Фосфорила- за печени	12,20 $p < 0,05$	9,70	1,77 $p = 0,5$	1,96
Фосфорила- за мышц	5,30 $p = 0,5$	5,46	1,65 $p < 0,01$	1,23

Примечание. Активность ферментов: альдолаза в усл. ед. /мг ткани за 10 мин.; фосфорилаза в мк молях фосфора/г. ткани за 30 мин. В случае окситиаминового авитаминоза ферменты определялись в центрифугатах и пересчет на мг белка (фосфорилаза в мкг фосфора на мг белка).

У гипervитаминозных голубей при таком способе введения витамина повышалась активность альдолазы скелетных мышц и не менялась активность фермента в мышце сердца. Известно, что при насыщении организма тиаминном накапливается гликоген в тканях (Стейгервальдт, 1939; Волынский З. М., 1949 и др.). В доступной литературе мы не нашли сведений об изучении фосфорилазной активности при различном насыщении организма тиаминном. В проведенных опытах у птиц, получавших в инъекциях тиамин, содержание гликогена в печени выше, чем у контрольных (гипervитаминоз — 87,79, контроль — 70,96 мк моль глюкозы/г. ткани, $p < 0,02$), а активность фосфорилазы угнетена. Подобные распределения были проведены и в мышцах этих голубей, но содержание гликогена в них не отличалось от контроля и активность фосфорилазы существенно не изменялась.

Недостатком моделей экспериментального пищевого В₁ — авитаминоза является изменение ряда показателей в связи с голоданием животных и возникновением вторичных сдвигов в других обменах. Острый В₁ — авитаминоз, вызванный введением окситиамина, лишен некоторых из указанных недостатков.

У подопытных птиц с острым окситиаминовым авитаминозом (таблица 2) угнеталась альдолаза скелетных мышц и сердца. Фосфорилазная активность растворимой фракции гомогената печени у авитаминозных голубей этой группы не менялась, а в мышцах — активировалась. Амилаза сыворотки крови оставалась неизменной, но угнеталась амилаолитическая активность гомогенатов поджелудочной железы у авитаминозных птиц (авитаминоз — 5,06, контроль — 6,33 мг субстрата/мг ткани за 10 мин., $p = 0,05$).

Активация гемагликолиза тиамином *in vitro* отмечена на эритроцитах животных (Гиммерих Ф. И., 1960). Нами на отмытых эритроцитах подопытных голубей определялась скорость гемагликолиза по потреблению глюкозы из инкубационной среды. При пищевом В₁ — авитаминозе гемагликолиз не угнетался. Отмечено повышение его у гипervитаминозных птиц (контроль — 0,261, гипervитаминоз — 0,412 мк моль глюкозы/час/млрд. эритроцитов, $p < 0,01$). Такая же тенденция наблюдается и у птиц, получавших тиамин в инъекциях.

Нет изменений гемагликолиза при окситиаминовом авитаминозе.

Активация альдолазы в тканях при B_1 — гипervитаминозе связана, очевидно, с усилением метаболизма углеводов. В противоположность этому активность фермента при авитаминозе понижается, что свидетельствует о торможении гликолиза вообще. Ферментемия при этом, видимо, обусловлена разрушением клеток (Бикнел, Прескот, 1953). Угнетение фосфорилазы в печени при гипervитаминозе может приводить к сбережению гликогена. В объяснении данных, полученных на голубях с острым окситиаминовым авитаминозом, можно исходить из общепринятых представлений о том, что окситиамин нарушает обменные процессы на уровне ТДФ. Но опыты с меченым S^{35} —тиамином (Островский Ю. М. и соотр., 1965) показывают, что введение окситиамина, возможно, изменяет в тканях и какие-то окислительно-восстановительные превращения самого тиаминa.

Целесообразность применения тиаминa и ТДФ в терапии сахарного диабета показана довольно убедительно (Боулин, 1952; Ашмонайте М. Н., Малаховский А. И., 1958 и др.) Биохимические показатели, характеризующие углеводный обмен (сахар и пировиноградная кислота крови, сахар мочи, ацетоновые тела и щелочной резерв в крови) исследовались неоднократно. Нет сведений об активности транскетолазы эритроцитов у больных сахарным диабетом, в частности, при назначении ТДФ, хотя он и имеет прямое отношение к активности пентозо-фосфатного цикла.

Нами обследовано три группы больных сахарным диабетом с различным лечением: 1-ая группа (19 человек) получали инсулин, ТДФ и тиамин; 2-ая группа (16 человек) — инсулин и тиамин; 3-я группа (17 человек) — только инсулин. Активность транскетолазы у больных сахарным диабетом ниже, чем у здоровых людей (диабет — 0,9 — 1,04; норма — 1,35 мк моль седогептулозы/час/млрд. эритроцитов, $p < 0,01$). Применение ТДФ у больных приводит к выраженному повышению активности этого фермента в эритроцитах (до лечения 0,89, к концу лечения — 1,49 мк моль седогептулозы/час/млрд эритроцитов, $p < 0,001$).

В контрольных группах больных подобного изменения в активности транскетолазы не наступило. Изменение других

показателей углеводного обмена у обследованных больных соответствовало литературным данным. Назначение тиамин и, особенно ТДФ, приводило у большинства больных к снижению сахара в крови, уменьшению глюкозурии, нормализации ацетоновых тел и увеличению щелочного резерва. Применение ТДФ приводило также к нормализации некоторых показателей липидного обмена: уменьшению общих липидов крови, повышению лецитин/холестеринового индекса. Полученные сдвиги подтверждают целесообразность применения тиамин и ТДФ в лечении сахарного диабета.

У intactных животных (кролики) была изучена активность транскетолазы эритроцитов после однократного введения тиамин и тиаминфосфатов. Активность фермента не изменяется после введения тиамин и ТДФ и усиливается после ТМФ. Возможно ТМФ обладает способностью проходить через оболочку эритроцитов без предварительного дефосфорилирования и, подвергаясь внутри клетки монофосфорилированию (Кислинг, 1956, 1957), быстрее других производных витамина включается в ферменты.

Влияние тиамин на углеводный обмен в изолированных системах.

Изучено потребление глюкозы из инкубационной среды в присутствии тиамин на изолированной диафрагме, срезах сердца, мозга, печени intactных и аллоксановодиабетных крыс. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3

ВЛИЯНИЕ ТИАМИНА НА ПОТРЕБЛЕНИЕ ГЛЮКОЗЫ ТКАНЯМИ ИНТАКТНЫХ ЖИВОТНЫХ И АЛЛОКСАНОВОДИАБЕТНЫХ

	Изолированная диафрагма		СРЕЗЫ							
			сердца		мозга		печени			
	К	О	К	О	К	О	К	О		
Intactные крысы	3,00	3,80	9,08	10,3	18,40	22,20	± 2,16	± 0,56		
	p < 0,02		p > 0,2		p < 0,02		p < 0,01			
Аллоксановый диабет	3,66	6,25	0,06	3,36	11,72	15,58	± 6,55	± 1,47		
	p < 0,02		p < 0,01		p < 0,05		p < 0,01			

Примечание Потребление глюкозы в мкг/мг ткани за 2 часа инкубации при 37°C. Для срезов печени—изменение количества редуцирующих веществ в инкубационной среде в том же выражении. Для тканей интактных крыс среда содержала 150 мг% глюкозы, для крыс с аллоксановым диабетом — 300 мг%.

Тиамин усиливает потребление глюкозы изолированной диафрагмой и в срезах мозга интактных крыс. Выход редуцирующих веществ в инкубационную среду из срезов печени угнетается в присутствии тиамин, а в ряде опытов даже наблюдается потребление глюкозы. Нет разницы между опытом и контролем в использовании глюкозы срезами сердца.

В проведенных опытах остается неясным, что оказывает влияние на потребление глюкозы: свободный тиамин или его фосфорные эфиры, так как в некоторых тканях фосфорилирование витамина идет быстро (Рысс С. М., 1963). Учитывая роль инсулина в фосфорилировании тиамин (Фиденза, Лавина, 1952; Кислинг, 1960), представлялось интересным повторить эти опыты на тканях животных с недостаточностью инсулина. Тиамин ($1 \cdot 10^{-5}$ М) усиливает потребление глюкозы изолированной диафрагмой, срезами сердца и мозга у крыс с аллоксановым диабетом (табл. 3). Выход редуцирующих веществ в среду из срезов печени уменьшается в присутствии тиамин. В тех же опытах на изолированных системах интактных животных и с аллоксановым диабетом обнаружено влияние тиамин на потребление кислорода тканями.

Повышение потребления глюкозы изолированной диафрагмой и срезами мозга интактных крыс при добавлении тиамин в инкубационную среду следует расценивать как активацию углеводного обмена в указанных тканях. Последнее частично может быть связано в какой-то мере с активацией тиаминсодержащих ферментов. Уменьшение поступления редуцирующих веществ в среду из срезов печени согласуется с обнаруженным ранее угнетением фосфоорилазной активности в печени этим витамином.

Усиление потребления глюкозы под влиянием тиамин сохраняется и на тканях животных с аллоксановым диабетом. Эффект появляется и на срезах сердца этих животных. Почему на фоне недостаточности инсулина витамин проявил свое действие в углеводном обмене, сказать трудно. Вполне

возможно, что усиление тиамином окислительных процессов (потребление кислорода срезами сердца интактных крыс увеличивалось) задевало в здоровых тканях только легко окисляемые субстраты и не влияло на нормально протекающий цикл гликолиза. Повреждение последнего при аллоксановом диабете создало какую-то брешь в обмене, куда подключились другие процессы, активируемые тиамином.

Сравнивая влияние витамина на интактных и аллоксан-диабетных животных, можно заключить, что тиамин в ряде случаев активирует углеводный обмен независимо от наличия инсулина в тканях. Если исходить из представлений, что активной формой витамина в тканях является только ТДФ, образование которого связано с наличием инсулина (Санада, 1958; Кислинг, 1960), то полученные нами результаты на крысах с аллоксановым диабетом явно противоречат таким представлениям. Правомерно предполагать поэтому возможность активного участия в обмене не только ТДФ, но и свободного тиамин или других его производных.

Изменение активности ферментов у птиц с различной обеспеченностью организма тиамином послужило предпосылкой к определению активности этих ферментов в гомогенатах тканей интактных животных в присутствии тиамин или его производных. Существенных сдвигов при этом обнаружено не было.

Изучение активности некоторых очищенных ферментов гликолиза в присутствии тиамин или его производных.

Приведенные ранее данные подтверждают предположение об участии тиамин в начальных реакциях обмена глюкозы. Опытами на целых организмах и на изолированных системах невозможно выяснить, влияет витамин непосредственно на фермент или оказывает действие на его активность через другие факторы. Только изучение выделенных и очищенных ферментов позволяет устранить многочисленные регулирующие механизмы клетки и целого организма, а также определить отношение самого энзима к добавленному реагенту. Но экспериментальные условия в этих опытах являются далеко не идеальными для оптимального ферментного катализа, что значительно осложняет перенос данных, полученных *in vitro*, на нативные ферментные системы клеток организма. Таким об-

разом, переходя к опытам *in vitro*, мы заранее предвидим указанные возражения и будем учитывать их при обсуждении полученных результатов.

Альфа-амилаза (α — 1,4 — глюкан — 4-глюкангидролаза, 3,2,1.1.).

Активность очищенной альфа-амилазы повышается в присутствии производных тиамин, не содержащих галлоидов. Тиамин — основание в концентрации $1 \cdot 10^{-6} \text{M}$ активирует фермент в среднем на 24% по сравнению с контролем. Отчетливо активировался фермент при добавлении в среду ТДФ — тетрагидрата и ТМФ — фосфата. В контрольных опытах неорганический фосфат и пирогосфат в эквимольных количествах были не эффективны.

Повышение активности альфа-амилазы в присутствии тиамин-основания, ТМФ, ТДФ — тетрагидрата, в опытах *in vitro* не исключает подобного взаимодействия и в организме. Возможно тиамин-основание, ТМФ, ТДФ — тетрагидрат улучшают связь фермента с субстратом, способствуют ионизации активных центров или лабилизуют субстрат.

Фосфорилаза (α 1,4—глюкан; ортофосфат — глюкозилтрансфераза. 2, 4, 1, 1).

Расщепление гликогена очищенной фосфорилазой мышц кролика угнеталось при добавлении в инкубационную среду тиамин (контроль — 81,7, опыт — 59,1 мкг фосфора мг белка, $p < 0,001$). Присутствие тиаминфосфатов не изменяло активности фермента. Синтез гликогена из гл-1-ф через фосфорилазную реакцию незначительно активировался ТМФ. Другие производные тиамин были не эффективны. Результаты этих опытов указывают на вероятность непосредственного взаимодействия между молекулами фосфорилазы и тиамин и согласуются с полученными нами ранее данными об угнетении фосфорилазы печени при V_1 — гипервитаминозе.

Гексокиназа (АТФ: d —гексоза-6-фосфотрансфераза, 2, 7.1.1). Гексокиназа из мышц кролика не изменяла активность при добавлении в среду ТДФ и смеси ТДФ с ТТФ. Не оказывал влияния ТДФ и на препарат из сердца. Добавление в среду смеси ТДФ и ТТФ в присутствии АТФ приводило к значительной активации гексокиназы сердца (контроль —

195, опыт — 286 мкг глюкозы /мг белка, за 15 мин, $p < 0,001$). Полученные результаты можно рассматривать как доказательство участия тиаминфосфатов в начальных реакциях обмена гексоз в миокарде. Можно предполагать, что тиаминфосфаты создают какие-то особые условия для фосфорилирования глюкозы за счет АТФ.

Альдолаза (кетозо-1-фосфат-альдегид-лиаза, 4.1.2.7). Обогащенный препарат альдолазы мышц в присутствии ТДФ незначительно увеличивал активность. Ни тиамин, ни его производные не изменяли активность кристаллической альдолазы мышц. Возможность непосредственного взаимодействия между молекулой фермента и витамина не подтвердилась. Видимо, изменение активности альдолазы в тканях птиц с различной обеспеченностью тиамином имеет адаптивный характер и связано с общей активацией гликолиза.

ВЫВОДЫ

1. Активность альдолазы мышц и сердца у голубей зависит от насыщения их организма тиамином. При В₁ — гипervитаминозе угнетается фосфорилаза печени и активируется гемагликолиз.

2. Потребление глюкозы из инкубационной среды изолированными тканями (диафрагма, срезы мозга) животных интактных и с аллоксановым диабетом усиливается при добавлении тиаминa ($1 \cdot 10^{-5} M$). На срезах сердца этот эффект наблюдается только у крыс с аллоксановым диабетом. Выход редуцирующих веществ в среду из срезов печени уменьшается в присутствии тиаминa.

3. Очищенная амилаза в присутствии препаратов витаминa, не содержащих галогенов (тиамин-основание, ТМФ, ТДФ — тетрагидрат), активнее расщепляет субстрат.

4. Расщепление гликогена очищенной фосфорилазой мышц угнетается тиамином.

5. Обогащенный препарат гексокиназы сердца при добавлении в инкубационную среду, содержащую АТФ, смеси ТДФ, ТТФ активнее фосфорилирует глюкозу.

6. Кристаллическая альдолаза из мышц не меняет активности в присутствии тиамин или его производных.

7. У больных сахарным диабетом понижена активность транскетолазы эритроцитов. При назначении ТДФ активность фермента повышается. Тиамин оказался неэффективным.

8. На основании всех полученных нами данных можно заключить, что тиамин помимо известного коферментного участия в транскетолазе пируват- и α -кетоглутаратдегидрогеназах, оказывает влияние и на некоторые начальные этапы углеводного обмена, действуя или непосредственно на уровне ферментов (фосфорилаза, амилаза, гексокиназа), или вызывая адаптивные сдвиги в других звеньях (альдолаза).

ПУБЛИКАЦИЯ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

1. Лукашик Н. К.
Островский Ю. М.
Доста Г. А. Тиамин и углеводный обмен в мышечной ткани. 4-ая науч. сессия Гродн. мед. ин-та, 1962, стр. 81. Тезисы.
2. Лукашик Н. К. Гемагликолиз у голубей с различной обеспеченностью организма тиамином. Там же стр. 183.
3. Лукашик Н. К. Влияние В₁, ТМФ, ТДФ на транскетолазную активность и уровень сахара в крови нормальных кроликов. Там же, стр. 184.
4. Лукашик Н. К. Влияние тиамин и некоторых его производных на активность альфа-амилазы. Укр. биох. ж. 1962, т. 34, № 6, стр. 897.
5. Лукашик Н. К.
соавтор Бродерзон Э. А. Влияние тиаминдифосфата (кокарбоксилаза) на некоторые показатели углеводного обмена у больных сахарным диабетом. 2-ая Всесоюз. конф. эндокринол. Тезисы, Москва, 1962, стр. 71.
6. Лукашик Н. К. К вопросу участия тиамин в углеводном обмене. Материалы 5-ой науч. сесс. ВНИИВ, Москва, 1963, стр. 29.

7. Лукашик Н. К.
соавтор Бродерзон Э. А.
Колтунова В. И. Влияние тиаминдифосфата на липидный обмен у больных сахарным диабетом. Здравоохр. Белоруссии, 1963, № 7, стр. 17.
8. Лукашик Н. К.
соавтор Островский Ю. М. Углеводный обмен при остром авитаминозе В₁, вызванном введением окситиамина. 3-я конф. по химии и обмену углеводов, Москва, 1963, стр. 52.
9. Лукашик Н. К. К взаимоотношению инсулина и тиамина в регуляции углеводного обмена. 1-й Всесоюз. биох. съезд, тезисы, вып. 2, стр. 300.
10. Лукашик Н. К.
Островский Ю. М. и др. Дифференциация специфических и неспецифических обменных сдвигов на модели острого авитаминоза В₁, вызванного однократной инъекцией окситиамина, Материалы 15-ой науч. сес. ин-та Питания АН СССР, 1964, стр. 70.
11. Osirovsky Yu.,
Lukashik, N., et al. On the Participation of Thiamine in specific and nonspecific Regulation on some Metabolic Pathways. Sixth International Congress of Biochem., N. Y.: 1964, abst., [X-67. p. 729.
12. Лукашик Н. К. Влияние тиамина на некоторые ферменты углеводного обмена. Глюкокиназа мышц и сердца. 5-я науч. сесс. Бродн. мед. ин-та тезисы, 1964, стр. 182.
13. Лукашик Н. К. О содержании гликогена в тканях при гипервитаминозе В₁. Там же, стр. 182.
14. Лукашик Н. К. Об отношении тиамина и некоторых его производных к обмену гексоз и гликогена. Там. же, стр. 184.