

Г. Д. СМЕРНОВ и Л. М. ДЫКМАН

**СОДЕРЖАНИЕ ТИАМИНА В НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ
КАРПОВЫХ РЫБ**

(Представлено академиком А. И. Опариным 26 IX 1949)

Деятельность нервной системы, согласно существующим данным, тесно связана с основным процессом, служащим источником энергии для нейрона, — с углеводным обменом, в частности, с его центральным звеном — окислением пировиноградной кислоты (^{1, 2}). В настоящее время нет достаточных данных для того, чтобы представить полную картину биохимических процессов, лежащих в основе возбуждения нейрона, однако несомненно, что одним из специфических для нервной ткани метаболических процессов, тесно связанных, с одной стороны, с возникновением возбуждения, а с другой, с углеводным обменом, является процесс образования и разрушения ацетилхолина.

Существует несомненная связь между синтезом ацетилхолина и определенными этапами углеводного обмена (^{3, 4}). Более того, ряд данных позволяет предполагать, что освобождение ацетилхолина вызывает деполаризацию оболочки нейрона, постоянная разность потенциала на которой обеспечивается процессами, зависящими от окислительного распада пировиноградной кислоты (⁵). Последний процесс осуществляется при участии кокарбоксилазы — пирофосфорного эфира тиамина, синтезируемого в тканях животных из поступающего с пищей тиамина (витамина В₁).

Этой зависимостью между углеводным и ацетилхолиновым метаболизмом в нервной системе следует объяснить ту тесную связь между ацетилхолином и тиамином, которая была обнаружена многими исследователями в физиологических экспериментах. Как то, так и другое вещество выделяются из поперечного разреза нерва при его возбуждении; тиамин обнаруживается одновременно с ацетилхолином в перфузионной жидкости изолированного сердца лягушки при раздражении блуждающего нерва; при дегенерации мякотного нерва в нем падает содержание как тиамина, так и ацетилхолина (⁶). Существует также ряд данных, показывающих, что тиамин меняет чувствительность некоторых тканей к ацетилхолину (⁷), тормозит холинэстеразу (⁸) и гистаминазу (⁹).

Однако, в то время как в отношении ацетилхолина известно, что он является постоянным и характерным компонентом нервной ткани, начиная с самых ранних этапов ее эволюционного развития, данные о распространении тиамина в нервной системе различных животных отсутствуют. Кроме того, известен обширный ряд животных, внутренние органы которых обладают мощной энзиматической системой — тиаминазой, расщепляющей тиамин на тиазол и пиримидин (¹⁰). В тканях карповых рыб, например, содержится настолько активная тиаминаза, что

у чернобурых лис развивались симптомы авитаминоза В₁, если в их рационе относительно небольшую долю составляли сырые карпы (¹¹). Содержит ли кокарбоксылазу и тиамин нервная ткань этих животных, лишенных, повидимому, возможности воспринимать из пищи неразрушенный тиамин?

Для решения этого вопроса необходима достаточно чувствительная методика определения содержания тиамина и кокарбоксылазы в тканях. Обычно применяемый для определения тиамина тиохромный метод недостаточно чувствителен, и пользование им осложняется образованием в экстрактах из нервной ткани, наряду с тиохромом, других флуоресцирующих веществ. В связи с этим мы приспособили для наших целей микробиологическую методику определения тиамина. Тестом служил аспорогенный дрожжевой грибок *Endomyces magnusii*, который, согласно исследованиям Е. Н. Одинцовой (¹²), обладает рядом преимуществ перед другими микроорганизмами, применяемыми в аналогичных методиках определения малых количеств тиамина и кокарбоксылазы.

Принцип метода заключается в том, что культура *Endomyces magnusii*, выросшая на среде, содержащей минимально необходимое для роста количество тиамина, почти не вызывает брожения тростникового сахара. Прибавление тиамина, а также кокарбоксылазы или тиазола вызывает усиление брожения, которое может быть определено манометрическим методом Варбурга по количеству выделившегося СО₂. Поскольку тиазол легко может быть удален из исследуемого раствора экстракцией хлороформом, этот метод дает возможность суммарного определения тиамина и кокарбоксылазы или «общего тиамина».

Для посева применялась агаровая минеральная среда Ридера, содержащая в 1 л 3 г (NH₄)₂SO₄, 0,7 г MgSO₄, 1 г KН₂PO₄, 0,1 г K₂HPO₄, 0,5 г NaCl, 0,4 г Са(NO₃)₂. Агар-агар, из которого готовился 1,5% раствор, в течение нескольких суток отмывался в проточной воде от следов тиамина. Добавляемый по ходу опыта сахар также освобождался от тиамина взбалтыванием с активированным углем или норитом в течение 30 мин. 2-суточная культура *Endomyces magnusii* на сусло-агаре высевалась на чашки Петри в условиях, обеспечивающих аэробные условия роста, и помещалась на 48 час. в термостат при 26°. Пригодная для тестирования культура отличается рядом морфологических признаков: форма клеток — удлинённая, округлая, хорошо видны многочисленные вакуоли, почти отсутствуют жировые включения, клетки не образуют длинных цепочек. Количество мертвых клеток не должно превышать 10% видимых в поле зрения под микроскопом; большее количество указывает на то, что из среды были полностью извлечены как тиамин, так и биотин. В этом случае при следующем посеве к среде следует добавить небольшое (до 0,5%) количество дрожжевого экстракта.

Смытая с чашек культура отсасывается на воронке Бюхнера, промывается 2—3 раза водой, слегка высушивается между листками фильтровальной бумаги (культура при этом не должна крошиться) и из нее готовится 8% суспензия в буферном фосфатном растворе (16 частей 0,2 М NaH₂PO₄ и 1 часть 0,2 М Na₂HPO₄).

В сосудик аппарата Варбурга помещается 1 мл суспензии, 0,5 мл 16% раствора очищенного от тиамина сахара и 0,5 мл исследуемого раствора. При таком соотношении растворов рН смеси равно 5,5. Перед помещением в ванну через систему пропускается азот для создания анаэробных условий. Интенсивность брожения измеряется при 30° в течение 3 час., причем для дальнейших расчетов берутся показания только 3-го часа, к этому времени интенсивность брожения обнаруживает отчетливую прямолинейную зависимость от количества добавленного тиамина.

При соблюдении описанных выше условий усиление брожения отме-

чалось при добавлении 0,001 γ (10^{-9} г) тиамин. Предварительными опытами, в которых брожение измерялось при добавлении различных количеств тиамин (от 0,001 до 0,030 γ), была установлена прямолинейная зависимость брожения от концентрации тиамин (рис. 1). Поэтому в последующих опытах по двум точкам (например, для 0,005 и 0,020 γ) определялось положение кривой и графически находилось содержание тиамин в исследуемой ткани по обнаруженному при добавлении экстракта усилению брожения.

Содержание общего тиамин определялось в нервах боковой линии и ткани мозга зеркальных карпов, сазанов и карасей. Тиамин извлекался из тщательно растертой с кварцевым песком ткани 0,1 N раствором серной кислоты (25 мл на 1 г ткани) в течение 30 мин. в кипящей водяной бане (при такой обработке кокарбоксилаза переходит в тиамин). После центрифугирования раствор нейтрализовался и соответствующее количество его бралось для испытания.

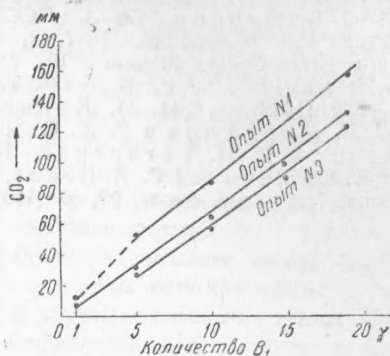


Рис. 1. Зависимость брожения *Endomycetes magnusii* от концентрации тиамин

Таблица 1

Содержание тиамин в γ на 1 г сырого веса ткани

Карповые рыбы		Кролики		
Мозг	Нерв бок. линии	Мозг (кора)	Мозг (бел. в-щ)	Сегмент. нерв
0,51	0,42	1,87	1,275	0,73
0,87	0,22	1,1	0,95	0,44
0,73	0,25	1,7	0,61	0,32
0,90	0,25			
0,78	0,37			
0,63	0,20			
0,63	0,38			

В ряде опытов для того, чтобы исключить возможность присутствия в ткани тиазола, полученный экстракт обрабатывался хлороформом; подобная обработка не уменьшала активности экстракта. Точно так же была исключена возможность ошибки за счет содержащегося в нервной ткани ацетилхолина: добавление к культуре ацетилхолина в количестве, соответствующем его содержанию в навеске (10 γ), не изменяло интенсивности брожения.

В табл. 1 приведены результаты, полученные в опытах на карповых рыбах, и для сравнения данные нескольких опытов, в которых определялось содержание общего тиамин в нервной ткани кроликов.

Полученные данные показывают, что, несмотря на содержание во внутренних органах карповых рыб активной тиаминазы, нервная ткань этих животных содержит тиамин в количестве лишь немногим более низком, чем нервная ткань млекопитающих. Как у карповых рыб, так и у кроликов в ткани мозга общего тиамин содержится больше, чем в нервах.

Поскольку в организме карповых рыб всасывание из кишечника целой молекулы тиамин можно считать исключенным, следует предположить, что ткани этих животных обладают способностью его синтезировать.

Обнаружение тиамин в нервной системе карповых рыб убедительно подчеркивает его значение в метаболизме нервной системы: несомненно, что тиамин является столь же обязательным биохимическим компонентом нервной ткани, как ацетилхолин и гистамин.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. В. Палладин, Укр. биохим. журн., 19, 293 (1947).
- ² R. A. Peters, Bull. Soc. Chim. Biol., 28, 700 (1946).
- ³ X. С. Коштоянц, ДАН, 24, 358 (1939).
- ⁴ X. С. Коштоянц, Сб. АН СССР, посвящ. 30-летию Великой Октябрьской Социалистической революции, 1947, 2, 437.
- ⁵ A. M. Shanes and E. S. Brown, Journ. Cell. Comp. Physiol., 19, 1 (1942).
- ⁶ A. Murali, Die Signalübermittlung im Nerven, 1946.
- ⁷ Е. Б. Бабский и П. Ф. Минаев, Физиол. журн. СССР, 34, 339 (1948).
- ⁸ И. Н. Книпст, Бюлл. эксп. биол. и мед., 3, 19 (1946).
- ⁹ С. Р. Мордашов и Р. А. Семина, там же, 25, в.1 (1948).
- ¹⁰ В. А. Энгельгардт и Р. И. Татарская, Биохимия, 13, 279 (1948).
- ¹¹ R. G. Green, W. E. Carlson and C. A. Evans, Journ. Nutrition, 21, 243 (1941).
- ¹² Е. Н. Одинова, Усп. совр. биол., 27, 63 (1949).