

УДК: 612.8.015—577.125.8

ВЛИЯНИЕ ГИПЕРВИТАМИНОЗА А НА МЕТАБОЛИЗМ  
ЦЕРЕБРОЗИДОВ И СУЛЬФОЦЕРЕБРОЗИДОВ  
ГОЛОВНОГО МОЗГА

ЧАЕВА Л. С., ФОМИЧЕВА Ю. В., ОПАРИНА Т. И.

Физиологический институт им. А. А. Ухтомского, Ленинград

В различных отделах головного мозга 3-недельных крыс (большие полушария, мозжечок, продолговатый мозг) определено содержание типичных гликолипидов миелина—цереброзидов и сульфocereброзидов в норме и при гипервитаминозе А. В этих условиях соотношение фракций цереброзидов и сульфocereброзидов остается неизменным, несмотря на выявленное увеличение содержания гликолипидов в больших полушариях.

Проведено исследование метаболизма двух фракций цереброзидов и сульфocereброзидов с использованием  $2[^{14}\text{C}]$ ацетата. Показано, что в больших полушариях и мозжечке удельная радиоактивность цереброзидов и сульфocereброзидов значительно выше, чем в продолговатом мозгу, что отражает различный уровень миелинизации в указанных отделах головного мозга 3-недельных крыс. Под влиянием избытка витамина А в организме наблюдалось отчетливое снижение включения радиоактивного предшественника для всех фракций гликолипидов исследованных отделов головного мозга, что можно расценить как одно из доказательств нарушения нормального процесса миелинизации.

Изучение метаболизма липидов НС продолжает привлекать внимание исследователей в связи с выяснением их роли в развитии демиелинизирующих заболеваний различной этиологии. Одним из возможных подходов к пониманию биохимических механизмов, вызывающих нарушение структуры миелина, является создание разного рода экспериментальных патологий аллергического энцефаломиелита, гиперфенилаланинемии и др. [1—3]. В модельных экспериментах нарушение образования миелина достигается более эффективно на растущих животных. Именно в этот период еще несформировавшаяся НС особенно чувствительна к воздействию неблагоприятных факторов. В качестве таковых могут выступать некоторые биологически активные вещества, в частности высокие концентрации витамина А (ретинола).

Хорошо известны многообразные физиологические функции витамина А в организме, связанные с его участием в зрительном акте, поддержании процессов роста, контролем над дифференцировкой эпителиальных тканей. В литературе имеются данные о его влиянии на липидный обмен головного мозга, однако этот вопрос изучен недостаточно. Отмечается как угнетение метаболизма липидов миелина при

аномальных концентрациях витамина А в организме [4, 5], так и отсутствие такого воздействия [6]. Считают, что токсичность избытка витамина А обусловлена появлением в плазме крови свободного ретинола, не связанного с белком [7]. Высказывается предположение, что витамин А принимает участие в регуляции транспорта липидов от эндоплазматического ретикулума к миелиновым мембранам, оказывая влияние на уровень свободного тубулина в мозгу [8]. Данная работа посвящена выяснению влияния высоких доз витамина А на метаболизм церебролипидов (Ц) и сульфocereбролипидов (СЦ) различных отделов головного мозга крысы.

#### Материалы и методы

Опыты ставили на белых беспородных крысах в возрасте 10 дней. С целью вызвать экспериментальный гипervитаминоз А крысам вводили раствор ретинол ацетата в абрикосовом масле. За один прием животное получало 1000 МЕ витамина А; всего проводили по 4 приема через день по схеме, предложенной в нашей лаборатории [9]. Контрольным животным вводили абрикосовое масло. Раствор витамина А вводили крысам с помощью специального шприца с шариком на конце. Животных декапитировали на 6-й день после окончания введения витамина, то есть в возрасте 22 дней, что соответствует наиболее активному периоду миелинизации. Концентрацию витамина А определяли по реакции с ТФУ [10].

Для исследования интенсивности обмена Ц и СЦ в качестве радиоактивного предшественника использовали  $2[^{14}\text{C}]$  ацетат в дозе 30 мкКи на 100 г массы тела (экспозиция 1 ч). После декапитации животного головной мозг промывали в физиологическом растворе, освобождали от кровеносных сосудов, отделяли большие полушария, мозжечок и продолговатый мозг.

Общие липиды из ткани мозга выделяли методом Folch и соавт. [11], ганглиозиды удаляли 0,1%-ным NaCl [12]. Ц и СЦ выделяли из промытого липидного экстракта методом ТСХ на силикагеле КСК в системе хлороформ-метанол-концентрированный аммиак (80:20:0,4). Способ выделения отдельных фракций гликолипидов описан ранее [13].

Определение суммарного содержания гликолипидов в липидном экстракте проводили методом Svennerholm [12]. Количественную оценку отдельных фракций Ц и СЦ осуществляли этим же методом в модификации Smith [14]. Радиоактивность фракций гликолипидов измеряли на сцинтилляционном счетчике типа «Beckman», (США). Все использованные методы подробно изложены в методическом руководстве [15].

#### Результаты и обсуждение

О развитии состояния гипervитаминоза судили по концентрации ретинола и его эфиров в плазме крови, печени и нервной ткани. Используемый метод [10] позволяет определить в крови и тканях со-

держание витамина А и его производных, поскольку большая часть введенного витамина А (ретинол-ацетата) в стенке кишечника подвергается переэстерификации и разносится по организму в виде эфиров ретинола [16]. Экспериментальные данные представлены в табл. 1.

Таблица 1

Содержание витамина А в различных органах на 6-й день после введения ретинола ацетата (имоль/г ткани)

Органы	n	Норма	Контроль	Витамин А
Глазма* крови	6	0,95±0,15	0,94±0,11	2,53±0,39 p** < 0,01
Печень	10	4,34±0,51	4,48±0,11	18,52±1,91 p < 0,001
Головной мозг	7	0,55±0,05	0,52±0,0	0,90±0,05 p < 0,001

Примечание \* — содержание витамина А в плазме крови выражено в имоль/мл;  
\*\* — достоверность различий во всех случаях рассчитана по отношению к контролю.

Полученные результаты свидетельствуют о резком повышении концентрации ретинола и его эфиров в плазме крови, печени и нервной ткани в 2,7; 4,1 и 1,7 раза соответственно в результате скармливания ретинола ацетата по нашей схеме. На основании этих данных можно сделать заключение о развитии состояния гипервитаминоза у подопытных животных.

Из различных отделов головного мозга крыс (большие полушария, мозжечок, продолговатый мозг) были получены экстракты общих липидов, в которых определено суммарное содержание Ц и СЦ. Результаты, полученные на 3-х группах животных, — норма (штатные), контрольные (введение абрикосового масла) и подопытные (гипервитаминоз А), приведены в табл. 2.

Таблица 2

Суммарное содержание цереброзидов и сульфocereброзидов (мг/г влажной ткани) в отделах головного мозга крыс в норме, контроле и при гипервитаминозе А (n=6)

Отделы мозга	Норма	Контроль	Опыт
Большие полушария	7,11±0,58 p > 0,05	6,92±0,64 p < 0,05	10,18±1,17
Мозжечок	12,90±0,51 p > 0,05	13,17±1,15 p > 0,05	13,52±0,53
Продолговатый мозг	15,52±0,3 p > 0,05	13,94±1,23 p > 0,05	17,11±1,72

Представленные данные свидетельствуют о том, что в норме отделы головного мозга 3-недельных крыс различаются по содержанию гликолипидов, что находится в соответствии с представлением о большей обогащенности миелином филогенетически более древних отделов ЦНС [17, 18].

Для всех отделов головного мозга не выявлено достоверных различий в содержании исследуемых гликолипидов между нормальными и контрольными группами животных. При гипервитаминозе А содержание гликолипидов существенно повысилось в больших полушариях (на 47%), а для мозжечка и продолговатого мозга эти изменения оказались статистически недостоверными ( $p > 0,05$ ).

Из общих липидов указанных отделов головного мозга выделены СЦ и 2 фракции Ц ( $C_1, C_2$ ) со значениями  $R_f$  соответственно 0,34, 0,45 и 0,55. Как нами было показано ранее, фракции цереброзидов различаются по составу жирных кислот. Фракция  $C_1$  в отличие от  $C_2$  содержит преимущественно гидроксигирные кислоты [18]. Определено содержание этих фракций гликолипидов в различных отделах головного мозга в контроле и в условиях гипервитаминоза А.

Таблица 3

Содержание фракций цереброзидов и сульфocereброзидов (мг/г влажной ткани) в отделах головного мозга крыс в контроле и при гипервитаминозе А ( $n=6$ )

Отделы головного мозга	Условия опыта	Фракции цереброзидов		Сульфocereброзиды
		$C_1$	$C_2$	
Большие полушария	контроль	$3,36 \pm 0,27$	$2,02 \pm 0,16$	$1,46 \pm 0,11$
	опыт	$4,18 \pm 0,23$	$2,13 \pm 0,19$	$1,73 \pm 0,09$
Мозжечок	р	$< 0,05$	$> 0,05$	$< 0,05$
	контроль	$6,11 \pm 0,49$	$6,07 \pm 0,49$	$0,90 \pm 0,07$
Продолговатый мозг	опыт	$5,97 \pm 0,22$	$6,67 \pm 0,24$	$0,83 \pm 0,03$
	р	$> 0,05$	$> 0,05$	$> 0,05$
Продолговатый мозг	контроль	$6,95 \pm 0,56$	$5,14 \pm 0,43$	$1,97 \pm 0,16$
	опыт	$7,18 \pm 0,15$	$6,93 \pm 0,55$	$2,52 \pm 0,23$
	р	$> 0,05$	$> 0,05$	$> 0,05$

Как видно из данных, представленных в табл. 3, введение высокой дозы витамина А вызвало неоднозначный характер изменения содержания фракции Ц больших полушарий головного мозга растущих крыс. А именно, содержание фракции  $C_1$  увеличилось на 24%, а фракции  $C_2$  практически не изменялось. Количество СЦ в больших полушариях возросло на 18%. При другой исследованной нами модели демиелинизирующего заболевания—гиперфенилаланинемии фракция Ц с гидроксигирными кислотами также оказалась наиболее чувствительной к избытку фенилаланина в организме [3]. Вероятно, в период миелинизации, когда биосинтез Ц происходит наиболее активно, метаболические различия между цереброзидными фракциями выражены в большей степени. При исследовании биосинтеза Ц в опытах *in vitro* показано, что именно гидроксисерамиды являются предпочтительными в качестве субстрата реакции. При этом показано, что  $\alpha$ -гидроксильрование жирной кислоты определяет скорость биосинтеза Ц [18]. В мозжечке и продолговатом мозгу не обнаружено

статистически достоверных изменений в содержании исследуемых гликофинголипидов при гипервитаминозе А.

В табл. 4 представлен расчет процентного соотношения фракций Ц<sub>1</sub> и СЦ в различных отделах головного мозга.

В контроле в больших полушариях в наибольшем количестве присутствует фракция цереброзидов Ц<sub>1</sub>, содержащая гидроксигирные кислоты, где на ее долю приходится свыше 50% суммарных гли-

Таблица 4  
Процентное соотношение фракций цереброзидов и сульфocereброзидов в контроле и при гипервитаминозе А (n=6)

Отделы головного мозга	Условия опыта	Фракции: цереброзидов		Сульфocereброзиды
		Ц <sub>1</sub>	Ц <sub>2</sub>	
Большие полушария	контроль	53,6±2,3	22,1±1,4	22,5±1,8
	опыт	55,4±1,6 -0,05	20,5±2,3 >0,05	20,0±1,7 -0,05
Мозжечок	контроль	46,6±0,3	46,4±0,7	6,9±0,7
	опыт	41,3±2,7 >0,05	49,3±3,5 >0,05	6,2±0,5 >0,05
Продолговатый мозг	контроль	9,8±1,0	36,1±1,7	14,1±1,0
	опыт	43,6±1,3 0,05	38,3±1,3 >0,05	16,0±2,5 >0,05

кофинголипидов. В мозжечке, по нашим данным, обе фракции Ц содержатся в одинаковом количестве, составляя в сумме свыше 90%. В то же время СЦ представлены в нем в наименьшем количестве и составляют не более 7% от общего содержания гликолипидов. Таким образом, отделы головного мозга характеризуются определенным соотношением фракций Ц и СЦ. При гипервитаминозе А это соотношение практически сохраняется во всех отделах мозга, в том числе и в больших полушариях, несмотря на увеличение абсолютного содержания гликолипидов в этом отделе.

Исследование влияния высоких доз витамина А на интенсивность включения радиоактивного 2[<sup>14</sup>C]ацетата в изучаемые гликофинголипиды представляло для нас особый интерес.

Из данных табл. 5 следует, что в контроле величина удельной радиоактивности (УР) фракции Ц<sub>1</sub> во всех отделах головного мозга была значительно выше по сравнению с фракцией Ц<sub>2</sub>, причем для продолговатого мозга это различие было выражено наиболее резко. Следует также указать, что в больших полушариях и в мозжечке УР обеих фракций Ц и СЦ существенно выше, чем в продолговатом мозгу. На основании этих данных можно сделать вывод о значительно более интенсивном включении радиоактивного предшественника в Ц, содержащие гидроксигирные кислоты. Известно, что именно эти кислоты наряду с другими длинноцепочечными жирными кислотами (C<sub>22</sub>—C<sub>24</sub>) являются наиболее характерными для жирнокислотного

состава Ц. Вероятно, в период активной миелинизации значимость этих Ц в организации структуры миелина особенно велика. Кроме того, различный уровень метаболизма гликолипидов в исследуемых отделах головного мозга указывает на то, что у крыс в 3-недельном возрасте процесс миелинизации происходит наиболее интенсивно в больших полушариях и мозжечке, а в продолговатом мозгу миелинизация к этому периоду уже миновала пик своей активности [17].

Таблица 5

Удельная радиоактивность цереброзидов и сульфocereброзидов (нмг/милл. мг) в отделах головного мозга в контроле и при гипервитаминозе А (n=6)

Отделы головного мозга	Условия опыта	Фракции цереброзидов		Сульфocereброзиды
		Ц <sub>1</sub>	Ц <sub>2</sub>	
Большие полушария	контроль	3457±319	2750±271	3693±327
	опыт	2313±235 <0.01	2182±118 <0.01	2584±168 <0.01
Мозжечок	контроль	3387±205	2231±145	4020±31
	опыт	1854±201 <0.01	1858±67 <0.05	2451±98 <0.001
Продолговатый мозг	контроль	2367±113	780±41	1240±118
	опыт	1767±191 <0.05	627±27 <0.01	81±63 <0.01

При гипервитаминозе А для всех фракций гликолипидов исследованных отделов головного мозга наблюдалось отчетливое снижение интенсивности включения радиоактивного 2[<sup>14</sup>C] ацетата. В большей степени это характерно для фракции Ц<sub>1</sub> в больших полушариях и в мозжечке, где величина УР уменьшалась на 34—45%. УР фракции Ц<sub>2</sub> во всех отделах понизилась менее существенно (на 17—20%). Снижение УР сульфocereброзидов в исследованных отделах мозга составило 30—39%. Таким образом, нами получены результаты, указывающие на существенное снижение интенсивности включения радиоактивного предшественника в Ц и СЦ головного мозга при гипервитаминозе А. Следует указать, что величина УР гомогената мозговой ткани, характеризующая общий уровень радиоактивности, не изменялась при гипервитаминозе, что согласуется с данными, ранее полученными в нашей лаборатории [9]. Не исключено, что при высокой концентрации витамина А снижается включение 2[<sup>14</sup>C] ацетата в непосредственные предшественники биосинтеза гликофосфолипидов. Так, по нашим предварительным данным, в этих условиях снижается УР свободных жирных кислот в микросомной фракции нервной ткани. Последнее может быть одной из причин снижения включения радиоактивного предшественника в керамидную часть молекул гликолипидов. Кроме того, обнаруженное нами увеличение содержания гликолипидов также может до некоторой степени объяснить снижение величины УР фракций гликолипидов за счет разбавления радиоактивной метки.

Данные литературы относительно действия избытка витамина А в диете на процесс миелинизации и, в связи с этим, на метаболизм липидов миелина немногочисленны и противоречивы. Имеются сведения о снижении их количества, особенно, свободного холестерина и фосфатидилэтаноламина в мозгу растущих крыс с гипervитаминозом А, а также обнаружено снижение включения [ $^{35}\text{S}$ ] сульфата в СЦ мозга [20]. Кроме того, показано, что избыток витамина А вызывает снижение содержания холестерина в больших полушариях мозга молодых крыс и возрастание количества эфиров холестерина, что сопровождается резким падением УР эфиров холестерина [8]. Из этого следует, что, если вопрос о влиянии избытка витамина А в организме на метаболизм СЦ мозга обсуждается, то метаболизм Ц, являющихся непосредственными предшественниками в биосинтезе СЦ, не выяснен.

Механизм действия витамина А и его производных всесторонне исследуется на молекулярном уровне. Доказано его участие в процессе гликозилирования гликоконъюгатов и гликопротеинов, являющихся обязательными компонентами биологических мембран. При этом в качестве акцептора углеводных остатков выступает ретирил фосфат, что показано на микросомных системах печени, некоторых эпидермальных и эпителиальных клетках, причем отмечается участие ретинолсвязывающего белка [21, 22]. Данные о существовании подобного механизма в НС отсутствуют. Тем не менее, на основании полученных нами результатов о значительном увеличении содержания гликолипидов в больших полушариях головного мозга можно предположить возможность вовлечения витамина А в транспорт галактозы с образованием UDP-галактозы, при конденсации которой с церамидом осуществляется биосинтез Ц и СЦ. В настоящее время трудно объяснить, каким образом витамин А оказывает влияние на сложный, многоступенчатый процесс миелинизации. Безусловно, требуются дальнейшие детальные исследования для выяснения этапа биосинтеза Ц и СЦ, наиболее чувствительного к уровню витамина А в организме.

## THE EFFECT OF HYPERVITAMINOSIS A ON THE METABOLISM OF BRAIN CEREBROSIDES AND SULFOCEREBROSIDES

CHAEVA L. S., FOMICHOVA Y. V., OPARINA T. I.

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

Cerebroside and sulfocerebroside contents were determined in various areas of 3 weeks-old rat brain (cerebral hemispheres, cerebellum, medulla oblongata) under hypervitaminosis A conditions. The data showed a stable correlation between cerebroside and sulfocerebroside fractions, although the content of glycolipids in hemispheres increased under the mentioned conditions.  $2 [^{14}\text{C}]$ -acetate was used for the investigation of glycolipid metabolism. The specific radioactivity of studied glycolipids was significantly higher in cerebral hemispheres and cerebellum

than in medulla oblongata. These results indicate the different level of myelination of the various areas of 3 weeks-old rat brain.

Hypervitaminosis A produces a drop in the labelling of cerebrostides and sulfocerebrostides of brain areas being under investigation that may be considered as one of the proofs of the disturbance in the myelination process.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Жаботинский Ю. М., Иоффе В. И. — В кн.: Экспериментальные аллергические демиелинизирующие заболевания нервной системы, Л., Медицина, 1975.
2. Таранова Н. П. — В кн.: Липиды центральной нервной системы при повреждающих воздействиях, Л., Наука, 1988.
3. Часва Л. С. Вopr. мед. химии, вып. 6, с. 51—54, 1983.
4. Harish C., Joshi N., Srivastava A. Int. J. Vit. Nutr. Res., v. 52, p. 303—307, 1982.
5. Joshi H. C., Shukla R. R., Srivastava N. Int. J. Vit. Res., v. 53, p. 19—22, 1983.
6. Keat E. L. J. Lipid Res., v. 11, p. 242—253, 1970.
7. Goodman D. S. J. Nat. Cancer Inst., v. 73, p. 1375—1379, 1981.
8. Joshi H. G., Misra U. K. Int. J. Vit. Nutr. Res., v. 51, p. 93—95, 1981.
9. Опарина Т. И., Путилина Ф. Е. Вестник ЛГУ, вып. 4, с. 113—116, 1986.
10. Dugan R. E., Frigerio N. A., Seibert J. M. Anal. Chem., v. 36, p. 114—117, 1964.
11. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G. H. J. Biol. Chem., v. 226, p. 497—509, 1957.
12. Svennerholm L. J. Neurochem., v. 1, p. 42—53, 1956.
13. Часва Л. С. — В кн.: Нервная система, вып. 13, Л., 1973.
14. Smith M. E. Adv. Lipid Res., v. 5, p. 241—278, 1967.
15. Часва Л. С. — В кн.: Методы биохимических исследований (под ред. М. И. Прохоровой), ЛГУ, 1982.
16. Olson J. A. Biochem. Soc. Trans., v. 14, p. 928—930, 1986.
17. Vrbaski S., Kastic D. J. Neurochem., v. 27, p. 983—984, 1976.
18. Часва Л. С. — Механизмы нервной интеграции, Тезисы Всесоюзной научной конференции, с. 48—50, Л., 1984.
19. Carter T. P., Kanfer J. V. J. Neurochem., v. 27, p. 53—62, 1976.
20. Clausen J. Eur. J. Biochem., v. 7, p. 575—582, 1969.
21. De Luca L. M., Bhat P. V., Sasak W., Adamo S. Federat. Amer. Soc. Exp. Biol., v. 38, p. 2535—2539, 1979.
22. Weber F. Proc. Nat. Soc., v. 42, p. 31—41, 1983.

Поступила 23. XII. 1990