



УДК 577.15.153:612.8.015.32

ВЛИЯНИЕ ГИПЕРДОЗ ВИТАМИНА А НА МЕТАБОЛИЗМ НЕЭСТЕРИФИЦИРОВАННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ НЕРВНОЙ ТКАНИ

ОПАРИНА Т. И., БЛЮДЗИН Ю. А., ПУТИЛИНА Ф. Е.

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

Исследовано субклеточное распределение и интенсивность включения меченого предшественника во фракцию неэстерифицированных жирных кислот (НЭЖК) головного и спинного мозга растущих крыс, подвергнутых воздействию больших доз витамина А. Пероральное введение ретинола ацетата с 10-го по 16-й дни постнатальной жизни в дозе 1600 МЕ каждому животному вызывало значительное повышение уровня НЭЖК во всех исследованных субклеточных фракциях, наиболее резкое в растворимой части клеток нервной ткани. Отмечено снижение включения $[2-^{14}\text{C}]$ ацетата в НЭЖК миелина спинного мозга подопытных крыс. Газохроматографический анализ показал возрастание доли пальмитиновой и линоленовой кислот и уменьшение процентного содержания арахидоновой и докозагексаеновой кислот в составе НЭЖК головного мозга при гипервитаминозе А. Наблюдаемые нарушения обмена жирных кислот нервной ткани под воздействием избытка ретинола, вероятно, могут быть связаны с повышением притока НЭЖК из плазмы крови через ГЭБ.

Гипервитаминоз А, симптомами которого являются задержка роста, множественные переломы костей, внутренние кровоизлияния, экзофтальмия, а также нарушения репродуктивной функции [1, 2], давно известен в клинической практике. В последние годы отмечается избыточное потребление витамина А (ретинола) жителями многих развитых стран [3], приводящее к развитию гипервитаминозных состояний. Полагают, что молекулярные механизмы действия ретинола связаны с регуляцией экспрессии генов и непосредственным участием в транспорте моносахаридных остатков [4, 5]. Гипервитаминоз А оказывает существенное влияние на обмен липидов в различных тканях: наблюдается повышение концентрации холестерина в крови [6], изменение интенсивности включения меченых предшественников в липиды печени, почек, легких [7]. Однако практически не исследовано воздействие избытка витамина А на состояние липидного обмена нервной ткани, особенно уязвимого в период интенсивной миелинизации. Ранее нами было отмечено нарушение динамики соотношения холестерина и его эфиров в развивающемся мозгу крыс, получавших большие дозы ретинола ацетата [8], что косвенно свидетельствует об аномальном протекании миелиногенеза. НЭЖК относят к минорным липидным компонентам нервной ткани, так как они содер-

жаться в зрелом мозгу в следовых количествах [9]. В то же время накопление НЭЖК в мозгу, или изменение состава этой липидной фракции, вероятно, может служить критерием серьезных метаболических нарушений в ЦНС или же аномального функционирования системы пластического обмена между плазмой крови и мозгом.

Целью настоящей работы было исследование влияния больших доз витамина А на субклеточное распределение, интенсивность метаболизма и состав НЭЖК головного и спинного мозга животных в период активного формирования миелина.

Материалы и методы

В опытах использовали 88 белых беспородных растущих крыс. Потомство одной самки делили на группы контрольных и подопытных животных. Гипервитаминоз А вызывали пероральным введением раствора ретиниола ацетата в абрикосовом масле в дозе 1000 МЕ каждому животному на 10-, 12-, 14- и 16-й дни постнатальной жизни. Одновременно контрольным крысам *per os* вводили такой же объем растворителя (0,1 мл). Животных декапитировали при помощи гильотины на 6-й день после последнего введения ретинилацетата, так как для витамина А характерно замедленное действие, что связано с ограниченной его выведением из организма [10]. За 1 ч до декапитации крысам делали подкожную инъекцию $[2-^{14}\text{C}]$ ацетата в дозе 30 мкКи/100 г массы тела.

Содержание суммарных ретининов в плазме крови, печени и нервной ткани оценивали при помощи реакции с трифторацетатом [11]. Субклеточные фракции головного и спинного мозга выделяли посредством дифференциального центрифугирования [12], для дальнейшего исследования использовали мембранные фракции миелина и микросом, а также супернатант после осаждения микросом, обозначаемый как цитозоль. Содержание белка в субклеточных фракциях определяли по методу Lowry и соавт. [13]; экстракцию липидов проводили смесью хлороформа и метанола в соотношении 1:2, согласно методическому руководству [14]. Разделение общих липидов на фракции осуществляли с помощью одномерной восходящей хроматографии в тонком слое силикагеля КСК с использованием системы растворителей гексан—диэтиловый эфир—уксусная кислота (15:25:4) фракции идентифицировали по стандартным препаратам холестерина, бегеновой кислоты и капроата холестерина («Serva», ФРГ). В используемой нами системе фракция НЭЖК хорошо отделялась от неэстерифицированного холестерина: по нашим данным, для НЭЖК значение R_f составило $0,40 \pm 0,02$, для холестерина— $0,50 \pm 0,02$. Содержание НЭЖК в элюатах ТСХ определяли методом Duncombe [15] в модификации Соколовой и соавт. [16]. Для измерения радиоактивности аликвот НЭЖК использовали сцинтилляционную смесь следующего состава: 4 г 2,5-дифенилоксазола и 300 мг 1,4-ди(2,5-фенил)оксазолил бензола в 1 л толуола, импульсы регистрировали на приборе «Beckman LS 100C» (США). Удельную радиоактивность выражали в имп/мин $\cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$, причем содержание углерода во фракции НЭЖК было принято равным 76% (рассчитано для стеариновой кислоты).

Газохроматографическое разделение жирных кислот проводили в виде их метиловых эфиров. Метилирование осуществляли в запаянных стеклянных ампулах по методу Peisker [17]. Эфирный экстракт анализировали на хроматографе «Цет-101» с колонкой, заполненной

силинизированным целитом-545 с нанесенной на него жидкой полярной фазой—полиэтиленгликольсукцинатом в количестве 10% по массе. Температура разделения—194—196°, газ-носитель—азот. Идентификацию пиков кислот проводили по их стандартам и по величинам времени относительно удерживания. Содержание каждой жирной кислоты выражали в процентах от суммы всех обнаруженных кислот, количественной характеристикой служила площадь пиков на хроматограмме. Статистическую обработку данных проводили с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Одной из предварительных задач настоящей работы был выбор адекватного способа воздействия на растущий организм избыточными дозами витамина А. При отработке методики вначале использовали подкожные инъекции масляного раствора ретинола ацетата в той же дозе [18], но при таком способе введения иногда наблюдали капсулирование введенного препарата, что затрудняло всасывание и приводило к изменению дозы витамина, поступающей в организм. При пероральном введении до 90% поглощенного витамина А абсорбируется из кишечника и разносится по организму в виде эфиров ретинола [19].

Суточная потребность взрослой крысы в витамине А составляет 30 МЕ, растущей—около 20 МЕ [1]. Тот и соавт. [20] установили, что содержание ретинола в сыворотке крови взрослых крыс, в течение 9-и дней находившихся на диете, содержащей 1500 МЕ витамина А в сутки, возрастает на 52%, а его запасы в печени увеличиваются почти в 5 раз. В наших экспериментах крысы получали общую дозу 4000 МЕ. О развитии состояния гипervитаминоза судили по концентрации суммарных ретиноидов в плазме крови, печени и нервной ткани (табл. 1). Как видно из представленных данных, у под-

Таблица 1

Содержание суммарных ретиноидов в плазме крови, печени и мозгу контрольных и подопытных животных (нмоль/г ткани)

Орган или ткань	Контроль (n=8)	Витамин А (n=7)	p
Плазма крови*	0.94±0.11	2.53±0.33	<0.01
Печень	4.48±0.51	18.52±1.91	<0.001
Головной мозг	0.57±0.04	0.90±0.06	<0.01
Спинальный мозг	0.62±0.06	0.84±0.07	<0.05

Примечание. * Содержание суммарных ретиноидов в плазме крови выражено в нмоль/мл; в скобках указано число опытов.

опытных крыс содержание ретиноидов в плазме повышено по сравнению с контролем в 2,7 раза, а запасы витамина А в печени возросли в 4,1 раза. достоверное повышение уровня ретиноидов отмечено также в нервной ткани—на 73 и 35% в головном и спинном мозгу соответственно.

Гипervитаминоз А вызывал существенное увеличение концентрации НЭЖК во всех исследованных структурах ЦНС (табл. 2), причем наиболее резко относительное содержание НЭЖК в расчете на 1 мг белка возрастало в цитозоле: в 2,5 раза—в головном и почти в

4 раза в спинном мозгу. В то же время удельная радиоактивность НЭЖК подопытных крыс практически не изменялась по сравнению с контролем, достоверное снижение было отмечено только в миелине спинного мозга (табл. 3). Интересно отметить, что доля НЭЖК от общей радиоактивности гомогената выделенных субклеточных фракций не менялась при гипервитаминозе А в цитозоле и возрастала в 2,2—3,1 раза в микросомах. Полученные данные позволяют предположить, что в условиях избытка ретинола в развивающейся нервной ткани происходит задержка включения НЭЖК, синтезированных в мозгу, или же поступивших из плазмы крови в ацилсодержащие липиды.

Таблица 2

Содержание неэстерифицированных жирных кислот в субклеточных фракциях головного и спинного мозга 22-дневных крыс (нг/мг белка)

Фракция	Контроль (n=7)	Гипервитаминоз А (n=6)	p
Головной мозг			
Микросомы	29.3±2.1	72.5±6.3	<0.001
Цитозоль	9.2±1.3	23.4±2.1	<0.001
Миелин	48.5±3.2	81.5±7.7	<0.01
Спинной мозг			
Микросомы	86.7±9.2	141.2±13.2	<0.01
Цитозоль	18.2±2.4	72.7±5.3	<0.001
Миелин	31.1±2.5	81.1±9.1	<0.001

Таблица 3

Удельная радиоактивность неэстерифицированных жирных кислот, выделенных из субклеточных фракций нервной ткани растущих крыс (нмп·мин⁻¹·мг(С)⁻¹)

Фракция	Контроль (n=7)	Гипервитаминоз А (n=6)	p
Головной мозг			
Микросомы	2416±213	1881±174	>0.05
Цитозоль	2459±269	1580±167	<0.05
Миелин	3216±344	2953±266	>0.05
Спинной мозг			
Микросомы	2219±295	1905±172	>0.05
Цитозоль	2395±278	1911±192	>0.05
Миелин	3419±310	2168±206	<0.01

Индивидуальный жирнокислотный состав фракции НЭЖК подтверждает последнее предположение: для гипервитаминозных животных характерно преобладание в составе НЭЖК пальмитиновой кислоты и резкое снижение доли арахидоновой и докозагексаеновой кислот (табл. 4). По-видимому, в условиях избытка витамина А вновь синтезированный пальмитат не сразу включается в сложные липиды мембран, а накапливается в цитозоле клеток нервной ткани. Кроме того, в мозгу подопытных крыс более чем в 5 раз возрастает содержание неэстерифицированной линоленовой кислоты, относящейся к

Таблица 4

Состав неэстерифицированных жирных кислот больших полушарий
головного мозга контрольных и подопытных крыс (в % от суммы)

Жирные кислоты		Контроль (n=4)	Вит. А (n=4)	p
Миристиновая	14:0	2,1±0,2	1,3±0,2	<0,05
Пентадекановая	15:0	1,3±0,2	1,0±0,1	>0,05
Пальмитиновая	16:0	17,1±0,9	29,1±2,3	<0,01
Пальмитолеиновая	16:1	2,6±0,3	3,0±0,3	>0,05
Стеариновая	18:0	25,3±2,1	29,0±2,3	>0,05
Олеиновая	18:1	18,3±0,7	15,3±0,9	>0,05
Линоленовая	18:3	1,0±0,2	5,3±0,6	<0,001
Эйкозеновая	20:1	1,2±0,1	1,0±0,1	>0,05
Генфкозеновая	21:1	1,2±0,2	2,0±0,3	>0,05
Арахидоновая	20:4	7,7±0,8	2,5±0,3	<0,01
Докозатетраеновая	22:4	2,8±0,5	1,4±0,2	<0,05
Докозагексаеновая	22:6	17,8±2,3	5,7±0,8	<0,01

Примечание. Первая цифра после названия кислоты означает число атомов углерода в молекуле, вторая—количество двойных связей. В таблице приведены жирные кислоты, содержание которых во фракции неэстерифицированных жирных кислот составляло не менее 1%.

незаменимым жирным кислотам. Снабжение мозга линоленовой кислотой осуществляется только из плазмы крови через ГЭБ [21]. Показано, что при избытке линоленовой кислоты в пище крыс в составе липидов мозга снижается содержание арахидоновой и докозагексаеновой кислот [22], аналогично обнаруженным нами изменениям в составе НЭЖК при избытке витамина А в растущем организме.

Таким образом, представленные результаты дают основание считать, что при гипervитаминнозе А в нервной ткани нарушаются ацил-обменные механизмы и, возможно, происходит усиленный приток НЭЖК из плазмы крови. Это приводит к аккумуляции неэстерифицированных жирных кислот в растворимой части клеток, а затем и проникновению их во внутренние и внешние клеточные мембраны, в том числе миелиновые, что нарушает их биохимическую стабильность.

THE EFFECT OF VITAMIN A OVERDOSES ON METABOLISM OF NON-ESTERIFIED FATTY ACIDS OF NERVOUS TISSUES

OPARINA T. I., BLYUDZIN YU. A., PUTILINA F. E.

A. A. Ukhtomsky Physiological Institute, Leningrad State University

The subcellular distribution and incorporation of labeled precursors into the fraction of non-esterified fatty acids (NEFA) in brain and spinal cord of growing rats treated by overdoses of vitamin A have been examined. Oral administration of retinyl acetate over a period of 10D16 days of postnatal development at a dose of 1000 IU resulted in significant increase of NEFA level in all subcellular fractions, the level in the cytosol being the highest. We have also detected a decrease in incorporation of [2-¹⁴C] acetate into NEFA of myelin of the spinal cord caused by vitamin A overdose. Analysis by gas-chromatography has indicated an increased content of palmitic and linoleic acids as well as the drop in the level of arachidonic and docosahexaenoic acids in NEFA fraction of the brain during vitamin A administration. The obser-

ved characteristics of fatty acids metabolism in the nervous tissue due to excessive levels of retinol could be related to increasing transport of plasma NEFA through the brain-blood barrier.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Morell T.* — In: *The Vitamins. Chemistry, physiology, pathology, methods* (eds. W. H. Sebrell, R. S. Harris), v. 1, p. 280—294, New York — London, Acad. Press, 1967.
2. *Kistler A.* *Biochem. Soc. Trans.*, v. 14, № 5, p. 936—939, 1986.
3. *McLaren D. S.* *Amer. J. Clin. Nutr.*, v. 34, № 8, p. 1611—1616, 1981.
4. *Weber F.* *Proc. Nutr. Soc.*, v. 42, № 1, p. 31—41, 1983.
5. *Zile M. H., Cullum M. E.* *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v. 172, № 2, p. 139—152, 1983.
6. *Sklan D.* *Brit. J. Clin. Nutr.*, v. 50, № 2, p. 409—416, 1983.
7. *Shukla R. R., Srivastava N., Misra U. K.* *Biol. Neonate*, v. 46, № 6, p. 285—290, 1984.
8. *Опарина Т. И., Путилина Ф. Е.* *Нейрохимия*, т. 7, № 1, с. 95—98, 1988.
9. *Bourre J. — M. C. R. Soc. Biol.*, v. 178, № 5, p. 595—611, 1984.
10. *Дмитровский А. А.* — В кн.: *Экспериментальная витаминология* (под ред. Ю. М. Островского), с. 131—172, Минск, Наука и техника, 1979.
11. *Dugan R. E., Frigerio N. A., Seibert J. M.* *Anal. Chem.* v. 36, № 1, p. 114—117, 1964.
12. *Манукян К. Г., Левонян К. Л., Степанян А. А., Киракосян Л. Т.* — В кн.: *Вопросы биохимии мозга*, т. 12, с. 68—78, Ереван, АН АрмССР, 1977.
13. *Lewry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* *Biol. Chem.*, v. 193, № 1, p. 265—275, 1951.
14. *Кейтс М.* *Техника липидологии*, М., Мир, 1975.
15. *Duncombe W. G.* *Biochem. J.*, v. 88, № 1, p. 7—10, 1961.
16. *Соколова Г. П., Кузнецова Г. Г., Золотова Л. А.* — В кн.: *Нервная система*, вып. 8, с. 53—58, Л., ЛГУ, 1967.
17. *Felsher K. J. J. Amer. Oil Soc.*, v. 14, № 1, p. 87—91, 1964.
18. *Опарина Т. И., Путилина Ф. Е.* *Вестник ЛГУ*, сер. 3, вып. 4, с. 113—115, 1986.
19. *Olson J. A.* *Biochem. Soc. Trans.*, v. 14, № 5, p. 928—930, 1986.
20. *Tom W. M., Fong I. Y. Y., Woo D. Y. H., Prasongwathana V.* *Chem. Biol. Interact.*, v. 50, № 3, p. 361—366, 1984.
21. *Dhopeswark G. A., Mead J. G.* *Adv. Lipid. Res.*, v. 11, p. 109—143, 1973.
22. *Huang D. H.* *Lipids*, v. 21, № 11, p. 697—701, 1987.

Поступила 12.I.1990