

Действительный член АМН СССР А. А. ПОКРОВСКИЙ,
Н. В. ЛАШНЕВА, И. Я. КОНЬ

ИНГИБИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ РЕТИНОЛА НА ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ В МИКРОСОМАХ ПЕЧЕНИ

В ряде работ показано, что большие дозы ретинола вызывают резкое нарушение стабильности мембран субклеточных структур (^{1, 2}). Механизм «мембранных» эффектов ретинола остается, однако, невыясненным. Учитывая, что одной из важных причин повреждения различных цитомембран может быть усиление перекисного окисления полиеновых жирных кислот фосфолипидов, предполагают, что действие ретинола на мембраны обусловлено его прооксидантными свойствами (³). В пользу этой гипотезы свидетельствуют особенности химического строения ретинола, его способность выступать в качестве донора электронов (⁴) и легко подвергаться аутоокислению (⁵). В то же время, по мнению других исследователей, витамин А обладает антиокислительными свойствами (⁶). Этот вопрос не может, следовательно, считаться выясненным и требует дальнейшего экспериментального изучения.

В связи с этим в настоящей работе предпринята попытка исследовать влияние витамина А как *in vitro*, так и *in vivo* на процессы перекисного окисления липидов. В качестве объекта исследования были избраны микросомы, в которых процессы перекисного окисления липидов протекают особенно интенсивно по сравнению с другими субклеточными фракциями (⁷). Изучалась активность двух наиболее исследованных систем перекисного окисления — НАДФ-Н-зависимой (НЗП) и аскорбатзависимой (АЗП).

Опыты *in vitro* проведены на изолированной фракции микросом печени растущих крыс-самцов (60—80 г) линии Вистар. Для выделения микросомальной фракции гомогенаты печени крыс, приготовленные на 1,15% растворе KCl, центрифугировали в течение 15 мин. при 90 000 *g*. Полученные надосадочные жидкости вновь центрифугировали в течение 60 мин. при 105 000 *g*. Осадки микросом ресуспендировали в среде выделения, так что суспензия содержала в 1 мл микросомы из 0,2 г печени. К 5 мл суспензии микросом добавляли по 0,2 мл ретинола* в перегнанном этаноле из расчета его конечной концентрации в пробах от $3,5 \cdot 10^{-6}$ до $1,75 \cdot 10^{-3}$ М. В контрольные пробы вносили по 0,2 мл этанола. Пробы тщательно перемешивали и инкубировали 30 мин. при 37°, после чего немедленно помещали на лед и отбирали материал для исследования интенсивности пере-

Таблица 1

Влияние ретинола на скорость перекисного окисления липидов в микросомах печени крыс *in vitro* (мкмол. МДА в 1 мин. на 1 г белка) *

Концентрация ретинола, М	НЗП	АЗП
Контроль	2,40±0,10	3,25±0,11
$3,5 \cdot 10^{-6}$	2,08±0,01	2,99±0,31 **
$3,5 \cdot 10^{-5}$	0,07±0,01	0,23±0,03
$1,75 \cdot 10^{-4}$	0	0
$5,25 \cdot 10^{-4}$	0	0
$1,05 \cdot 10^{-3}$	0	0
$1,75 \cdot 10^{-3}$	0	0

* Представлены средние данные ($\bar{X} \pm Sx$) из 4—8 опытов.

** $P > 0,05$, в остальных случаях $P < 0,05$.

* В опытах был использован ретинол («Serva», ФРГ), чистота которого была подтверждена хроматографически и спектрофотометрически.

кисного окисления липидов. Активность систем НЗП и АЗП оценивали по скорости образования малонового диальдегида (МДА) — одного из продуктов перекисного окисления ненасыщенных жирных кислот — с помощью теста с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) ⁽⁸⁻⁹⁾.

Как видно из табл. 1, инкубация суспензии микросом с ретинолом приводила к резкому подавлению активности как НЗП, так и АЗП. Тенденция к снижению скорости перекисного окисления липидов отмечалась уже при минимальной исследованной концентрации ретинола $3,5 \cdot 10^{-8}$ М. С увеличением концентрации витамина в пробе степень его ингибирующего воздействия на перекисное окисление липидов в обеих системах возрастала, так что при концентрации $3,5 \cdot 10^{-5}$ М отмечалось практически полное угнетение процессов НЗП и резкое падение (до 7% от контроля) АЗП. При дальнейшем увеличении концентрации ретинола ($1,75 \cdot 10^{-4}$ — $1,75 \cdot 10^{-3}$ М) образование МДА в обеих системах не было выявлено вовсе.

Для исключения возможности того, что витамин А может препятствовать образованию хромогена при реакции МДА с ТБК, в пробы, содержавшие МДА, образовавшийся в ходе инкубации микросом с НАДФ-Н или аскорбатом, непосредственно перед проведением ТБК-теста вносили ретинол ($3,5 \cdot 10^{-5}$ — $1,75 \cdot 10^{-4}$ М) или этанол (контроль). При этом оказалось, что интенсивность окраски (и следовательно, количество МДА) в опытных и контрольных пробах была практически одинаковой. Таким образом, ретинол не оказывает непосредственного влияния на взаимодействие МДА с ТБК, и выявленное уменьшение ТБК-положительного материала в микросомах при их обработке витамином обусловлено истинным снижением содержания МДА в пробах.

Другим подходом к изучению влияния ретинола на перекисное окисление липидов в микросомах явилось определение содержания в микросомах диеновых конъюгатов — другого класса продуктов перекисного окисления ненасыщенных жирных кислот. Микросомы инкубировали с ретинолом в описанных выше условиях, после чего пробы немедленно охлаждали и добавляли к ним для остановки реакций перекисного окисления ЭДТА (в конечной концентрации 0,004 М). Экстракцию липидов и определение содержания диеновых конъюгатов проводили по методу Плацера ⁽¹⁰⁾. Проведенные исследования показали, что содержание диеновых конъюгатов в микросомах, обработанных ретинолом, было значительно меньше, чем в интактных частицах: при концентрации ретинола $3,5 \cdot 10^{-5}$ М $\Delta E_{233} = -0,127$ (среднее из 3 определений).

Таким образом, исследования, проведенные с помощью различных методов оценки интенсивности перекисного окисления липидов, свидетельствуют о выраженном ингибирующем действии ретинола на эти процессы *in vitro*.

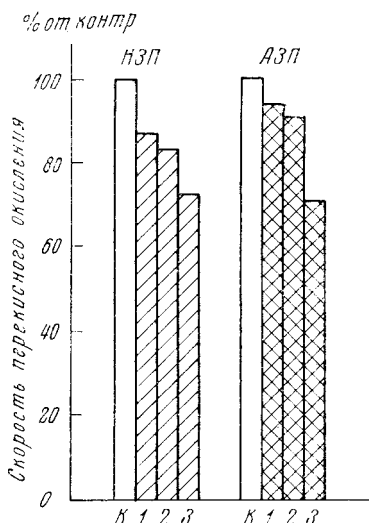
Представляло значительный интерес выяснить, оказывает ли витамин А сходное действие и в условиях *in vivo*. С этой целью была исследована интенсивность процессов НЗП и АЗП в микросомах, выделенных из печени растущих крыс-самцов, получавших токсические дозы витамина. Опыты были проведены на крысах-самцах линии Вистар (60—80 г), содержащихся на общевиварном рационе. Животным вводили ежедневно через зонд в желудок по 50 000 МЕ ретинил-пальмитата в 0,2 мл подсолнечного масла. Контрольные крысы получали эквивалентные объемы подсолнечного масла. Животных забивали на 2-й, 4-й, 6-й дни опыта, т. е. после дачи им 50 000, 150 000 и 250 000 МЕ витамина А соответственно. Проведенные исследования показали (рис. 1), что введение крысам больших количеств витамина А сопровождается снижением активности НЗП и АЗП. Некоторое уменьшение скорости перекисного окисления было выявлено уже после введения 50 000 МЕ витамина. С увеличением дозы вводимого витамина нарастала и степень угнетения перекисного окисления липидов, причем снижение активности НЗП и АЗП было выражено примерно в равной степени. Результаты исследования действия витамина А на перекисное окис-

ление липидов *in vivo* в значительной мере коррелируют, следовательно, с данными, полученными *in vitro*.

Таким образом, полученные в настоящей работе данные свидетельствуют о том, что витамин А в исследованных концентрациях оказывает значительное ингибирующее воздействие на процессы перекисного окисления липидов в микросомах. Этот факт не согласуется, по-видимому, с предположением о том, что лабилизирующее мембраны действие ретинола определяется его прооксидантными свойствами.

При обсуждении возможных механизмов ингибирующего действия ретинола на перекисное окисление липидов следует отметить, что НЗП, по мнению ряда авторов, тесно связано с НАДФ-Н-оксидазной системой, осуществляющей метаболизм различных ксенобиотиков и эндогенных субстра-

Рис. 1. Активность систем перекисного окисления липидов в микросомах печени крыс в ходе развития гипервитаминоза А. К — контроль, 1 — 2-е сутки опыта (50 000 МЕ витамина А), 2 — 4-е (150 000 МЕ витамина А), 3 — 6-е сутки опыта (250 000 МЕ витамина А). Приведены средние данные из опытов на 4–6 крысах для каждой группы. Активность НЗП и АЗП в микросомах печени контрольных животных составляла 2,95 и 3,64 мкмоль МДА в 1 мин. на 1 г белка (соответственно)



тов и, по-видимому, конкурирует с оксидазами смешанной функции за НАДФ-Н и цитохром P_{450} (³, ¹¹). В связи с этим интересно, что исследование деметилазной активности (как интегрального показателя работы системы НАДФ-Н — цитохром P_{450}) в печени опытных животных, проведенное параллельно с изучением перекисного окисления липидов, показало, что при гипервитаминозе А скорость деметилирования аминопирина также значительно (на 48,5%) снижена. Можно думать поэтому, что ретинол либо каким-то образом блокирует транспорт электронов в микросомах, либо, являясь активным акцептором протонов, вызывает убыль восстановленного НАДФ-Н в системе и, как следствие, торможение НЗП. Вместе с тем, полученные в настоящей работе данные о близкой чувствительности к ингибирующему действию ретинола не только НЗП, но и неферментной, аскорбат-зависимой системы перекисного окисления, в большей степени свидетельствуют в пользу предположения о том, что в основе выявленного эффекта ретинола лежит его прямое антиоксидантное действие.

Полученные нами результаты согласуются с наблюдениями (⁶), отмечавшими снижение количества перекисей липидов в крови больных атеросклерозом под влиянием препаратов витамина А. Интересно, что в опытах (¹²) по определению перекисей липидов в печени крыс иодометрическим методом показано увеличение отношения перекись/витамин А при недостаточности витамина А. Все это позволяет высказать предположение о том, что при определенных условиях витамин А может выступать в качестве антиоксиданта.

Наличие у ретинола антиоксидантных свойств представляет особый интерес в связи с имеющимися в литературе данными (^{13–14}) о возможном

участии перекисей липидов в регуляции клеточного деления, интенсивность которого в значительной степени определяет скорость роста и развития. Ключевая же роль витамина А в этих процессах общеизвестна.

Важно подчеркнуть, что ингибирующее действие ретинола на перекисное окисление липидов в опытах *in vitro* проявлялось при концентрациях, достаточно близких к физиологическим и идентичных тем концентрациям витамина, которые вызывали нарушения процессов дифференцировки эпителиальных тканей и трансформацию клеток ороговевающего эпителия в классических опытах Фелл и Мелланби (¹⁵). Можно думать поэтому, что наблюдавшиеся нами эффекты ретинола играют определенную роль в реализации его физиологического действия, и в частности влияния на рост, развитие и дифференцировку тканей.

Институт питания
Академии медицинских наук СССР
Москва

Поступило
15 V 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ J. T. Dingle, J. A. Lucy, *Biol. Rev.*, v. 40, 422 (1965). ² A. A. Pokrovsky, I. Ja. Kon, A. O. Natanson, *Intern. J. Vit. Nutr. Res.*, v. 42, 2, 253 (1972). ³ Ю. А. Владимиров, А. И. Арчаков, Перекисное окисление липидов в биологических мембранах, М., 1972. ⁴ F. U. Lichti, J. A. Lucy, *Biochem. J.*, v. 112, 221 (1969). ⁵ J. A. Lucy, *Biochem. J.*, v. 96, 1, 12P (1965). ⁶ В. И. Калмыкова, А. А. Дмитриевский, В кн.: Структура, биосинтез и превращение липидов в организме животного и человека. Тезисы докладов симпозиума, Л., 1972, стр. 59. ⁷ J. D. Desai, P. L. Sawant, A. L. Tappel, *Biochim. et biophys. acta*, v. 86, 277 (1964). ⁸ А. И. Арчаков, В. М. Девиченский и др., *Биохимия*, т. 33, 3, 479 (1968). ⁹ E. D. Wills, *Biochem. J.*, v. 113, 2, 315 (1969). ¹⁰ Z. Placer, L. Kuzela, *Acta biol. med. Germ.*, v. 21, 1, 121 (1968). ¹¹ S. Orrenius, G. Dallner, L. Ernster, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 14, 329 (1964). ¹² J. Glavind, *Brit. J. Nutr.*, v. 27, 1, 19 (1972). ¹³ Е. В. Бурлакова, В сборн. Актуальные вопросы современной онкологии, М., 1968, стр. 50. ¹⁴ N. Wolfson, K. M. Wilbur, F. Bernheim, *Exp. Cell Res.*, v. 10, 2, 556 (1956). ¹⁵ H. B. Fell, E. Mellanby, *J. Physiol. (London)*, v. 119, 4, 470 (1953).