



<sup>1</sup>Тринити колледж,  
Дублин, Ирландия

<sup>2</sup> Университет  
Джонса Хопкинса,  
школа медицины,  
Балтимор, США

## Неметаболизированная фолиевая кислота в сыворотке: исследования непосредственных эффектов вещества у людей, употребляющих обогащенные продукты питания и добавки\*

П. Келли<sup>1</sup>, Дж. МакПартлин<sup>1</sup>, М. Гоггинз<sup>2</sup>, Д.Г. Вайр<sup>1</sup>, Дж.М. Скотт<sup>1</sup>

Адрес для переписки: Joseph McPartlin, JMCPRTLN@TCD.ie

Известно, что прием фолиевой кислоты до и после зачатия снижает частоту дефектов нервной трубки. Стратегия обогащения основных продуктов питания фолиевой кислотой подразумевает возможность воздействия неметаболизированной фолиевой кислоты на организм людей на протяжении всей жизни. Главный риск повышения уровня фолиевой кислоты в крови заключается в маскировке диагноза дефицита кобаламина при пернициозной анемии, в результате чего неврологическое заболевание может прогрессировать. Другие риски не изучены в полной мере. Например, влияние *in vivo* хронического воздействия синтетической формы витамина на клетки взрослого человека и клетки плода никогда не исследовалось на общепопуляционном уровне. В статье представлены результаты исследования динамики концентрации неметаболизированной фолиевой кислоты в сыворотке у молодых и пожилых добровольцев в ответ на употребление ими обогащенных этим витамином продуктов питания. Участники исследования в рамках 5-дневной схемы употребления обогащенных готовых зерновых продуктов и обогащенного хлеба в дополнение к своему обычному питанию получали пороговую дозу 266 мкг фолиевой кислоты с каждым приемом пищи, обеспечивающую появление в сыворотке неизменной фолиевой кислоты. Добровольцы, которые получали фолиевую кислоту в виде изотонического раствора, молока или белого хлеба, также употребляли пороговую дозу > 200 мкг. Исходя из моделей потребления продуктов питания в США, маловероятно, что обогащение муки на уровне 1,4 мг/кг приведет к наличию фолиевой кислоты в сыворотке, если предположить, что продукты будут употребляться в течение всего дня. Однако повышение уровня содержания витамина может привести через много лет к повторному появлению фолиевой кислоты в сыворотке, особенно у людей из нецелевых групп, употребляющих обогащенные продукты питания в больших количествах. «Безопасный уровень потребления», составляющий 1 мг/сут фолатов, установленный Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США, также может приводить к появлению фолиевой кислоты в сыворотке. Кроме того, повторное появление фолиевой кислоты в сыворотке, вероятно, будет определяться у многих женщин, принимающих рекомендованные 400 мкг/сут фолиевой кислоты для профилактики развития дефектов нервной трубки у плода.

**Ключевые слова:** обогащение продуктов питания, добавки, фолиевая кислота, сыворотка, безопасность, порог метаболизма, дефекты нервной трубки

\* Опубликовано в Am. J. Clin. Nutr. 1997. Vol. 65. № 6. P. 1790–1795.



## Введение

В нескольких исследованиях была установлена связь между дополнительным приемом фолатов и снижением частоты дефектов нервной трубки, что обусловило появление новых международных рекомендаций, в которых нормы потребления фолатов женщинами детородного возраста были увеличены [1]. Были предложены следующие стратегии по обеспечению женщин фолатами в период до зачатия и в период беременности:

- дополнительный прием фолатов в форме таблеток;
- пропаганда включения в обычный рацион питания продуктов, богатых фолатами, например, бобовых, зеленых овощей, фруктов и обогащенных готовых зерновых продуктов;
- обогащение основных продуктов питания фолиевой кислотой, предписанное на государственном уровне или предпринимаемое без соответствующих рекомендаций на уровне отрасли.

Клинический опыт показывает, что не все женщины репродуктивного возраста будут дополнительно употреблять 400 мкг/сут фолиевой кислоты для профилактики развития дефектов нервной трубки у плода, в силу незнания пользы такого применения или забывчивости. Возможность придерживаться разнообразного питания и включение в рацион продуктов, богатых фолатами, также есть не у всех женщин, в частности, у женщин из группы риска (с низким доходом и уровнем образования). В этой связи обогащение фолиевой кислотой основных продуктов питания признается методом, который с наибольшей вероятностью позволит обеспечить поступление рекомендованного количества фолатов. Однако и у этой стратегии есть спорные моменты. Во-первых, обеспечить женщин рекомендуемым суточным количеством фолиевой кислоты возможно только при условии обогащения продуктов достаточно высокими дозами витамина. Во-вторых, остаются вопросы безопасности и рацио-

нальности повсеместного использования обогащенных фолатами продуктов, поскольку возникает риск получения витамина в избыточном количестве лицами из целевых групп.

Показано, что высокие пероральные дозы фолиевой кислоты минуют обычный механизм всасывания фолатов. Это приводит к появлению в сыворотке как 5-метилтетрагидрофолата – обычной циркулирующей формы витамина, так и фолиевой кислоты [2, 3]. Проблема токсичности в контексте программ обогащения, вероятно, связана с воздействием окисленной, неметаболизированной формы витамина, которая присутствует у людей, употребляющих обогащенные продукты в больших количествах в течение жизни. С биохимической точки зрения наличие неметаболизированной фолиевой кислоты в кровотоке препятствует эффективной диагностике дефицита кобаламина – пернициозной анемии. К тому же хроническое воздействие синтетической, чужеродной для организма человека формы витамина на клетки плода, а также и на клетки взрослого человека может быть потенциально вредным [4]. Наконец, заметный успех химиотерапии с использованием антифолатов, которые ограничивают доступность фолатов для опухолевых клеток, должен вызывать беспокойство в отношении тех усилий, которые предпринимаются для повышения потребления фолатов населением.

Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration, FDA) было предложено обогащать фолиевой кислотой зерновые продукты (1,4 мг/кг муки), что, по оценкам, позволит обеспечить дополнительное потребление 100 мкг/сут этого витамина. Однако люди, употребляющие зерновые продукты в значительном количестве, вероятно, будут получать более высокое количество фолиевой кислоты [5]. Одновременно FDA установило безопасное верхнее

предельное значение для фолиевой кислоты, составляющее 1000 мкг/сут, признав таким образом, что эффекты длительного воздействия повышенных концентраций этого вещества на ткани организма не подвергались оценке [6]. Центры по контролю и профилактике заболеваний США (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) и Рабочая группа по фолиевой кислоте (Prevention Folic Acid Working Group) [7] предложили повысить уровень обогащения до 3,5 мг (и даже 7,0 мг) на кг муки, чтобы максимально увеличить количество женщин, гарантированно получающих рекомендованные 400 мкг витамина в день.

Учитывая вышесказанное, нами было проведено исследование с целью определить пороговую дозу обогащения фолиевой кислотой для ряда продуктов питания, превышение которой после приема пищи приводило бы к обнаружению неметаболизированной фолиевой кислоты в сыворотке крови.

## Материалы и методы исследования

Участники исследования были представлены двумя возрастными категориями. Одна группа состояла из здоровых добровольцев в возрасте 18–42 лет ( $26,04 \pm 5,67$  лет; 5 мужчин, 18 женщин), набранных из числа студентов университета и персонала лаборатории. В другую группу входили пожилые здоровые добровольцы в возрасте 63–82 лет ( $70,47 \pm 5,36$  лет; 5 мужчин, 25 женщин), наблюдающиеся в гериатрическом отделении длительного пребывания (больница Св. Джеймса, Дублин). Все добровольцы дали информированное согласие на участие в исследовании, прошли клиническое и лабораторное обследование. Исследование было разрешено этическим комитетом больницы.

## Протоколы экспериментов

*Эксперимент 1:* всасывание фолиевой кислоты из обогащенных готовых зерновых продуктов и хлеба у людей (возраст 18–42 лет), при-

держивающихся обычного рациона питания.

Цель эксперимента заключалась в определении пороговой дозы фолиевой кислоты, принимающейся внутрь, при превышении которой в сыворотке крови определялась неметаболизированная фолиевая кислота.

14 здоровых добровольцев в возрасте 18–42 лет должны были включать в свой рацион обогащенные фолиевой кислотой готовые зерновые продукты и хлеб в течение 5 дней. До начала исследования у участников брали образец крови для определения уровня фолатов в эритроцитах и концентрации фолатов и фолиевой кислоты в сыворотке. Затем участников разделили на семь пар, каждой из которых давали фолиевую кислоту в виде обогащенного готового зернового продукта и хлеба с общим суточным потреблением 90, 400, 800, 900, 1000, 1100 и 1200 мкг.

За самый низкий уровень фолиевой кислоты было принято количество витамина, содержащееся, согласно упаковке, в одной порции кукурузных хлопьев («Келлоггс», Манчестер, Великобритания). Общее суточное количество фолиевой кислоты было распределено между одной порцией кукурузных хлопьев (25 г) и двумя порциями (2 × 30 г) белого хлеба. Хлеб (имеющийся в продаже как белый хлеб из теста на молоке) обогащали путем добавления нескольких мкл свежеприготовленного раствора фолиевой кислоты (10 г/л) в 10 точек, находящихся на одинаковом расстоянии на отдельных ломтиках хлеба, с помощью микропипетки в количествах от 266 до 800 мкг на два кусочка (2 × 30 г). Затем хлеб заворачивали в фольгу, хранили в замороженном виде, накануне потребления его оттаивали при комнатной температуре.

Увеличивали содержание фолиевой кислоты (всего 133–400 мкг, табл. 1) в кукурузных хлопьях с помощью того же метода, который применяли для хлеба. Порции кукурузных хлопьев до использования хранили при комнатной

температуре в виде герметично запечатанных порций в темном месте.

Каждому участнику ежедневно вечером выдавали суточный рацион обогащенной фолиевой кислотой пищи, которую он должен был употребить на следующий день по такой схеме: в 08:00 – кукурузные хлопья, 13:00 – хлеб и 18:00 – хлеб. Обогащенная пища добавлялась к обычному рациону питания в течение 4 дней. В остальном рацион питания был привычным, за исключением запрета на употребление в течение этого периода других пищевых продуктов, обогащенных фолиевой кислотой (каждому участнику выдавали полный перечень обогащенных продуктов, представленных на рынке Ирландии, включая готовые зерновые продукты и определенные марки молока и хлеба). В последнее утро исследования через 2,25 ч после приема последней порции обогащенных кукурузных хлопьев у добровольцев брали образцы крови.

*Эксперимент 2:* всасывание фолиевой кислоты, растворенной в изотоническом растворе, у лиц в возрасте 22–40 лет.

По предварительным полученным данным, время достижения максимальной концентрации ( $T_{max}$ ) фолиевой кислоты в сыворотке у здоровых добровольцев после приема пероральной дозы, растворенной в изотоническом растворе (Диоралит компании Rhone Poulenc Rorer), составляло 80 минут. С учетом этих данных были отобраны 6 добровольцев (в возрасте 22–40 лет), каждый из которых должен был принять одну дозу фолиевой кислоты в растворе Диоралит (50 мл) в трех дозировках: 400, 300 и 200 мкг с 2-недельным перерывом. Добровольцев просили воздерживаться во время исследования от употребления продуктов, обогащенных фолатами. Образцы крови брали натощак и проводили анализ на общее содержание фолатов и фолиевой кислоты в сыворотке до каждого приема препарата и по достижении  $T_{max}$  после. Затем в исследова-

ние включили еще 5 добровольцев (в возрасте 21–35 лет), и они повторили схему приема с дозой 200 мкг.

*Эксперимент 3:* всасывание фолиевой кислоты из хлеба у пожилых людей.

В ходе эксперимента стремились определить дозу фолиевой кислоты в обогащенном хлебе, при которой неметаболизированный витамин будет появляться в кровотоке у здоровых пожилых людей.

Имеющийся в продаже белый хлеб из теста на молоке обогащали фолиевой кислотой в количестве от 150 до 600 мкг на два ломтика (2 × 30 г) по методике, описанной выше. В этот эксперимент включили 30 пациентов гериатрического отделения длительного пребывания (63–82 лет). У них заранее взяли образцы крови, определили уровень фолатов в эритроцитах и концентрации фолатов и фолиевой кислоты в сыворотке. Пациенты предварительно принимали таблетки фолиевой кислоты 400 мкг/сут в течение 18 дней. После чего каждый участник получал постоянную дозу фолиевой кислоты, употребляя обогащенные ломтики хлеба в течение 3 дней подряд в 08:30 и 18:00, наряду с едой, не содержащей фолиевую кислоту, состоящей из чая и дополнительных тостов (30 г) со сливочным маслом. Остальные продукты питания в течение дня не должны были содержать фолиевую кислоту на протяжении всего эксперимента. Утром последнего дня исследования у участников брали образцы сыворотки и эритроцитов натощак для анализа на содержание фолатов. Далее они получали свою стандартную суточную дозу фолиевой кислоты в хлебе (2 × 30 г), через 2,25 ч после этого у них брали второй образец крови для определения содержания фолиевой кислоты в сыворотке.

*Эксперимент 4:* всасывание фолиевой кислоты из молока у пожилых участников исследования.

16 пожилых пациентов (63–80 лет) были включены в эксперимент для определения концентраций фоли-



евои кислоты в сыворотке после длительного приема продуктов питания, обогащенных фолиевой кислотой. В свой привычный рацион питания участники включили и постоянно употребляли обогащенное фолиевой кислотой молоко (380 мкг/л) и готовые зерновые завтраки. По оценкам, эти участники получали фолиевую кислоту в суточной дозе от 172 до 190 мкг в дополнение к потреблению фолатов из обычной пищи. Для анализа концентраций фолатов в эритроцитах брали образец крови натощак после ночного воздержания от приема пищи. Каждому участнику эксперимента давали имеющееся в продаже нежирное молоко (200 мл), обогащенное фолиевой кислотой (200 мкг), которое выпивалось вместе с едой, не содержащей фолиевую кислоту и состоящей из чая и тостов из белого хлеба (60 г) со сливочным маслом и вареньем. Второй образец крови брали через 2,25 ч. Аликвоты сыворотки, взятой до и после исследования, оценивали на предмет содержания фолиевой кислоты и общего содержания фолатов.

### Анализ образцов

Образцы крови брали у добровольцев до и после применения фолиевой кислоты или продуктов, обогащенных фолиевой кислотой. После самопроизвольного сворачивания крови отделяли сыворотку и хранили ее при температуре -20 °С. Сыворотку исследовали на предмет общего содержания фолатов, используя метод с *Lactobacillus casei* [8]. Концентрации фолиевой кислоты в сыворотке определяли с помощью процедуры, включавшей депротеинизацию образца сыворотки с перхлоратом перед фракционированием фолиевой кислоты методом высокоэффективной жидкостной хроматографии и анализа хроматографических фракций с использованием *Lactobacillus casei* [3]. Образцы для определения фолатов в эритроцитах готовили путем разведения 1:10 цельной крови аскорбиновой кислотой (1% м/о) и анализировали с использованием *Lactobacillus casei*.

### Статистический анализ

Был выполнен анализ результатов исследования с использованием

методов описательной статистики, t-критериев (парных и непарных), двухфакторного дисперсионного анализа (Analysis of Variance, ANOVA) и апостериорного анализа Шеффе (post hoc Scheffé) с помощью статистической программы DATA DESK для Макинтош, версия 4.1 («Дата Декрипшинс Инк.» (Data Descriptions Inc.), Итака, Нью-Йорк).

### Результаты

#### Эксперимент 1

На момент начала эксперимента у всех участников уровень фолатов в эритроцитах находился в диапазоне нормальных значений (> 150 мкг/л) (табл. 1). У всех добровольцев после включения в рацион обогащенных фолиевой кислотой готовых зерновых продуктов и хлеба отмечалось значительное повышение общего содержания фолатов в сыворотке. Неметаболизированную фолиевую кислоту выявили в образце сыворотки после приема пищи у участников эксперимента, получавших 800 мкг/сут фолатов и выше (перед забором крови они употребляли пищу,

Таблица 1. Содержание фолиевой кислоты и общее содержание фолатов в сыворотке у людей, принимавших фолиевую кислоту и придерживающихся обычного рациона питания

Участник исследования	Уровень фолатов в эритроцитах, мкг/л	Пероральное потребление фолиевой кислоты, мкг/сут			Общее количество фолатов, мкг/л		Фолиевая кислота, после приема пищи, мкг/л
		Кукурузные хлопья	Хлеб	Всего	Натощак	После приема пищи*	
1	195	90	000	90	10,75	11,50	0,00
2	156	90	000	90	8,75	15,00	0,00
3	162	133	266	400	4,75	9,00	0,00
4	158	133	266	400	7,25	16,00	0,00
5	164	266	533	800	7,50	19,75	3,66
6	167	266	533	800	15,50	19,50	1,10
7	164	300	600	900	9,00	18,50	1,53
8	153	300	600	900	6,00	19,25	3,25
9	306	333	666	1000	19,00	28,50	11,45
10	162	333	666	1000	8,00	27,50	4,36
11	327	366	733	1100	12,50	22,50	2,94
12	195	366	733	1100	–	17,50	1,00
13	195	400	800	1200	4,75	24,00	8,77
14	160	400	800	1200	14,00	19,25	4,06

\* Различия статистически значимы по сравнению с общим содержанием фолатов натощак,  $p < 0,0001$  (применен парный t-критерий).

Таблица 2. Изменения содержания фолиевой кислоты в сыворотке и общего содержания фолатов в сыворотке у участников эксперимента, перорально принимавших фолиевую кислоту в изотоническом растворе

Участник	Общее содержание фолатов, мкг/л		Фолиевая кислота, мкг/л	
	Натощак	После приема пищи*	Натощак	После приема пищи**
<i>Фолиевая кислота, перорально, 400 мкг</i>				
1	23,40	45,60	0,00	1,98
2	9,40	28,00	0,00	1,00
3	17,80	28,00	0,00	0,00
4	16,80	36,00	0,00	1,19
5	18,80	40,00	0,00	4,62
6	9,00	21,40	0,00	0,00
<i>Фолиевая кислота, перорально, 300 мкг</i>				
1	15,00	19,25	0,00	1,55
2	7,80	21,80	0,00	0,00
3	14,80	25,00	0,00	0,00
4	17,60	26,80	0,00	1,00
5	34,60	40,20	0,00	1,30
6	18,80	25,60	0,00	0,00
<i>Фолиевая кислота, перорально, 200 мкг</i>				
1	14,00	24,00	0,00	0,00
2	12,60	27,25	0,00	0,00
3	9,80	35,00	0,00	0,00
4	19,00	31,25	0,00	0,00
5	32,40	36,75	0,00	0,00
6	21,40	28,00	0,00	0,00
7*	6,60	13,60	0,00	0,00
8	9,00	12,00	0,00	0,00
9	6,40	17,80	0,00	0,00
10	5,00	18,00	0,00	0,00
11	10,20	15,20	0,00	0,00

\* Различия статистически значимы по сравнению с общим содержанием фолатов натощак,  $p = 0,067$  (применен двухфакторный дисперсионный анализ).

\*\* Различия статистически значимы по сравнению с концентрацией фолиевой кислоты натощак,  $p = 0,059$  (применен двухфакторный дисперсионный анализ).

\* 7–11 – дополнительные участники эксперимента.

содержащую 266 мкг и более фолиевой кислоты).

### Эксперимент 2

Неизменная фолиевая кислота была обнаружена в сыворотке у 4 из 6 участников эксперимента, получавших дозу 400 мкг, у 3 из 6, получавших дозу 300 мкг, и ни у одного из тех, кто получал дозу 200 мкг (табл. 2). Из 5 дополнительных участников эксперимента, получавших дозу 200 мкг, ни у одного не была выявлена неметаболизированная фолиевая кис-

лота в сыворотке. Двухфакторный дисперсионный анализ с использованием в качестве независимых переменных участника и группы показал различие между группами по частоте определения неметаболизированной фолиевой кислоты, которое практически достигало уровня значимости ( $p = 0,059$ ). По результатам двухфакторного дисперсионного анализа было отмечено также незначительное различие между группами по такому показателю как общее содержание фолатов в сыворотке.

Апостериорный анализ (Шеффе) показал, что эффект был связан с различием между группами, получавшими 200 и 400 мкг витамина в сутки ( $p = 0,06$ ).

### Эксперимент 3

Фолиевая кислота в сыворотке участников эксперимента, получавших  $\leq 200$  мкг/сут фолиевой кислоты вместе с хлебом, не была обнаружена (табл. 3). Фолиевая кислота в сыворотке была определена у 3 из 5 участников эксперимента, которые получали



300 мкг/сут, у 4 из 6 участников эксперимента, получавших дозу 400 мкг/сут, и у всех участников эксперимента, получавших дозу 500 или 600 мкг/сут. Двухфакторный дисперсионный анализ с использованием в качестве независимых переменных участника и группы показал значимое различие между группами по реакции неметаболизированной фолиевой кислоты ( $p=0,0015$ ). По результатам апостериорного анализа (Шеффе), различия в воздействиях были значимыми только между схемами приема доз 600 и 200 мкг/сут ( $p=0,011$ ). Двухфакторный дисперсионный анализ определения в сыворотке суммарного фолата показал, что никакого значимого различия между группами воздействий не было.

#### Эксперимент 4

После приема молока, обогащенного фолиевой кислотой, отмечалось значительное повышение общего содержания фолатов в сыворотке (табл. 4). Однако ни у одного из участников эксперимента фолиевая кислота в сыворотке не была обнаружена.

#### Обсуждение

Обогащение продуктов питания фолиевой кислотой приветствовалось в качестве эффективной меры по снижению частоты дефектов нервной трубки, а также профилактики болезней артерий [9]. Предложенный FDA подход к обогащению продуктов питания фолиевой кислотой, направленный на то, чтобы в среднем обеспечивать дополнительное поступление фолиевой кислоты в количестве 100 мкг/сут, на сегодняшний день является самым взвешенным в отношении эффективности и безопасности [6]. Вопросы безопасности программ обогащения продуктов в основном вызваны присутствием метаболитически не измененной фолиевой кислоты в кровотоке при пероральном применении этой синтетической формы витамина. С.Е. Jr. Butterworth и Т. Tamura [10], С. J. Dickinson [11] и другие уче-

Таблица 3. Концентрации фолатов в крови у 30 пожилых участников эксперимента до и после перорального приема фолиевой кислоты с хлебом

Участник	Уровень фолатов в эритроцитах, мкг/л	Общее содержание фолатов, мкг/л		Фолиевая кислота, мкг/л	
		Натошак	После приема пищи	Натошак	После приема пищи*
<i>Фолиевая кислота, перорально, 150 мкг/сут</i>					
1	825	21,00	17,00	0,00	0,00
2	375	13,00	21,50	0,00	0,00
3	330	20,00	23,00	0,00	0,00
4	302	9,50	11,00	0,00	0,00
5	560	21,00	20,50	0,00	0,00
6	421	31,50	40,00	0,00	0,00
<i>Фолиевая кислота, перорально, 200 мкг/сут</i>					
7	621	18,00	19,50	0,00	0,00
8	583	24,00	22,50	0,00	0,00
9	397	17,50	21,00	0,00	0,00
10	783	37,80	41,00	0,00	0,00
11	309	17,00	13,50	0,00	0,00
12	476	35,00	35,00	0,00	0,00
13	605	32,50	45,00	0,00	0,00
<i>Фолиевая кислота, перорально, 300 мкг/сут</i>					
14	820	53,50	49,50	0,00	1,09
15	594	31,50	40,00	0,00	0,00
16	315	17,50	18,00	0,00	1,96
17	382	19,00	19,00	0,00	1,08
18	200	11,50	12,00	0,00	0,00
<i>Фолиевая кислота, перорально, 400 мкг/сут</i>					
19	1234	46,50	45,50	0,00	5,75
20	925	36,50	39,00	0,00	4,62
21	482	75,00	75,00	0,00	0,00
22	155	10,50	15,50	0,00	2,06
23	545	23,00	29,00	0,00	0,00
24	345	34,50	37,50	0,00	2,15
<i>Фолиевая кислота, перорально, 500 мкг/сут</i>					
25	468	28,50	28,50	0,00	1,62
26	186	17,50	22,50	0,00	1,42
27	120	16,00	26,25	0,00	1,13
<i>Фолиевая кислота, перорально, 600 мкг/сут</i>					
28	265	17,50	19,00	0,00	1,03
29	394	25,50	30,00	0,00	4,76
30	537	51,50	49,50	0,00	7,22

\* Различия статистически значимы по сравнению со значениями, полученными натошак,  $p=0,0015$  (применен двухфакторный дисперсионный анализ). Апостериорный анализ (Шеффе) показал, что в зависимости от количества воздействующего вещества различия были значимыми только между группами, получавшими 600 и 200 мкг ( $p=0,011$ ) и 600 и 150 мкг ( $p=0,011$ ).

гинекология

Таблица 4. Содержание фолиевой кислоты и общее содержание фолатов в сыворотке участников эксперимента до и после приема 200 мкг фолиевой кислоты с молоком

Участник	Общее содержание фолатов, мкг/л			Фолиевая кислота, мкг/л	
	Уровень фолатов в эритроцитах	Натоцак	После приема пищи	Натоцак	После приема пищи
1	315	10,40	12,80	0,00	0,00
2	382	4,60	14,80	0,00	0,00
3	200	2,85	4,80	0,00	0,00
4	152	3,25	4,00	0,00	0,00
5	545	15,20	16,40	0,00	0,00
6	345	8,20	10,80	0,00	0,00
7	468	9,60	14,00	0,00	0,00
8	186	2,70	3,40	0,00	0,00
9	120	2,70	11,60	0,00	0,00
10	265	-	-	0,00	0,00
11	394	10,80	15,20	0,00	0,00
12	537	-	-	0,00	0,00
13	385	7,20	10,80	0,00	0,00
14	348	5,60	6,80	0,00	0,00
15	235	1,20	2,50	0,00	0,00
16	572	7,80	11,60	0,00	0,00

\* Различия статистически значимы по сравнению с общим содержанием фолатов натоцак,  $p=0,0014$  (применен парный t-критерий).

ные, проанализировав аспекты безопасности и токсичности, пришли к выводу о том, что фолиевая кислота безопасна в большинстве случаев, даже при применении ее в количествах, превышающих физиологическую норму. Например, клинические схемы лечения, включающие использование противоэпилептических препаратов или антифолатов у онкологических больных, не приводят к существенному снижению эффективности препаратов при одновременном применении фолиевой кислоты [12–14]. Однако в других клинических ситуациях необходимо проявлять осторожность, анализируя возможности влияния на эффективность антифолатной терапии. Заметный успех антифолатных препаратов в последние годы должен вызывать беспокойство в отношении тех усилий, которые предпринимаются для повышения уровня потребления фолатов населением. Очень мало информации о воз-

можном отрицательном влиянии фолиевой кислоты во время химиотерапии антифолатными препаратами при онкологических заболеваниях. Одним из основных вариантов приобретенной устойчивости опухолей к терапии метотрексатом является амплификация экспрессии фермента дигидрофолатредуктазы [15], субстратом которого является фолиевая кислота. Кроме того, еще предстоит получить эпидемиологические доказательства рисков, связанных с потенциальным хроническим воздействием синтетического вещества, то есть фолиевой кислоты, на ткани плода в результате обогащения фолиевой кислотой продуктов питания. Самый обсуждаемый риск, связанный со стратегией обогащения продуктов питания фолатами, – это маскировка неврологических осложнений дефицита кобаламина у пациентов с пернициозной анемией [11]. С физиологической и биохимической точек зрения

риск пернициозной анемии возникает не из-за отсутствия природных фолатов, а из-за нарушения поступления фолиевой кислоты в ткани. Кишечный транспорт фолатов происходит в тонкой кишке в основном в ходе насыщенного рН-зависимого процесса [16] с кинетическими значениями уравнения Михаэлиса – Ментен для транспорта, которые подходят для процессов с нормальными количествами эндогенных пищевых фолатов. Перед тем как попасть в систему крови, фолиевая кислота подвергается восстановлению и метилированию до 5-метилтетрагидрофолата. Эта циркулирующая форма витамина является метаболически неактивной до тех пор, пока она не деметилируется в тетрагидрофолат, в процессе чего в клетках из гомоцистеина образуется метионин. После этого тетрагидрофолат может использоваться как кофактор для биосинтеза предшественников ДНК. Деметилирование 5-метил-



тетрагидрофолата катализируется ферментом метионинсинтазой, которой требуется кобаламин в качестве кофактора. Учитывая известную специфичность субстрата фолилполиглутаматсинтетазы, маловероятно, что при дефиците кобаламина 5-метилтетрагидрофолат сможет удерживаться клеткой до удаления метильной группы метионинсинтазой, поскольку эта форма фолата плохо подходит для полиглутамилирования [17]. Следовательно, при дефиците кобаламина лечение 5-метилтетрагидрофолатом не будет приводить к регенерации костного мозга.

Тем не менее, как косвенно показали M. Lusock и соавт. [2] и P. Kelly и соавт. [3], при применении фолиевой кислоты в высоких дозах нормальный механизм всасывания дополняется ненасыщаемым механизмом транспортировки. В отличие от клеточного поглощения 5-метилтетрагидрофолата, фолиевая кислота включается в метаболически активные фолаты из тканей при проникновении в клетку посредством восстановления ферментом дигидрофолатредуктазой до тетрагидрофолата. Эта форма фолата легко подвергается полиглутамилированию и удерживается клеткой для биосинтеза предшественников ДНК. Таким образом, гематологический ответ вызывается не только при дефиците фолатов, но и при дефиците кобаламина, поскольку фермент метионинсинтаза не нужен для кофакторов фолатов, участвующих в биосинтезе пурина и пиримидина.

Несколько исследований *in vitro* выявили противоположные эффекты фолиевой кислоты и 5-метилтетрагидрофолата при дефиците витамина B<sub>12</sub>. Так, G. Tisman и V. Herbert [18] показали, что в клетках костного мозга здоровых людей поглощение 5-метилтетрагидрофолата в два раза превышало поглощение фолиевой кислоты. Однако в костном мозге у пациентов с пернициозной анемией поглощение 5-метилтетрагидрофолата было лишь незначительно выше, чем поглощение

фолиевой кислоты, при этом поглощение обоих веществ было пониженным. J. Metz и соавт. [19], K. Ganeshaguru и A.V. Hoffbrand [20], а также J. Zittoun и соавт. [21] установили, что фолиевая кислота частично корректировала нарушение подавления дезоксиуридина в костном мозге пациентов с дефицитом кобаламина, а 5-метилтетрагидрофолат в этом отношении был неэффективен.

Рефрактерность к фолиевой кислоте, в отличие от 5-метилтетрагидрофолата, при лечении неврологических последствий дефицита кобаламина, видимо, объясняется тем, что при непосредственной ассимиляции фолиевой кислоты клеткой происходит потеря дополнительной функции фолата, а именно его способности синтезировать метионин и, следовательно, S-аденозилметионин для реакций метилирования [22]. Способность фолата действовать в качестве донора метильных групп в этом случае нарушается в результате пониженной активности фермента метионинсинтазы, которая нуждается в кобаламине. Есть множество клинических данных о вредных неврологических последствиях лечения фолиевой кислотой пациентов с пернициозной анемией, накопленных за период до конца 1950-х гг., когда была выявлена взаимосвязь фолатов и кобаламина [11]. Сама по себе фолиевая кислота не является опасной, но она обладает способностью маскировать прогрессирование фонового неврологического заболевания.

В настоящем исследовании мы рассматривали появление фолиевой кислоты в сыворотке в ответ на поглощение фолиевой кислоты из продуктов питания. Раньше в качестве показателя биодоступности фолатов использовалось кратковременное повышение уровней фолатов в плазме [23]. По кривым «концентрация – время» можно получить ценные сравнительные данные по эффекту, например, конкретного исследуемого вещества или продукта питания [24, 25]. Однако недо-

статок построения таких кривых связан с тем, что для получения поддающейся измерению непосредственной концентрации в сыворотке нужны дозы фолиевой кислоты > 1 мг. Предшествующие исследования с применением 3 мг фолиевой кислоты показали, что T<sub>max</sub> фолиевой кислоты и 5-метилтетрагидрофолата составляет 1,3 ч при пероральном приеме фолиевой кислоты в виде физиологического раствора в сравнении с 2,25 ч при приеме фолиевой кислоты, содержащейся в хлебе [3]. В данном исследовании мы хотели определить присутствие или отсутствие неметаболизированной фолиевой кислоты в сыворотке в концентрациях, сравнимых с концентрациями нормального циркулирующего 5-метилтетрагидрофолата в ответ на дозы ≤ 1 мг. По этой причине концентрацию витамина определяли по одному образцу крови, который брали после приема пищи в соответствующий момент времени T<sub>max</sub> после приема исследуемых продуктов питания.

К настоящему исследованию появления фолиевой кислоты в сыворотке в ответ на пероральный прием фолиевой кислоты применимы две оговорки. Первая – чтобы избежать проблемы термодеструкции фолиевой кислоты во время производства продуктов питания, фолиевую кислоту в виде раствора добавляли к пище и высушивали на воздухе после обработки. Неопределенное разложение фолиевой кислоты из-за обработки могло бы запутать результаты, особенно при применении более чем одного продукта питания. Вторая оговорка заключается в том, что уровни обогащения, которые применялись в нашем исследовании, были выше для кусочка хлеба, чем предусматривается FDA. Это было вызвано необходимостью определить концентрацию фолиевой кислоты в сыворотке в ответ на непосредственный прием фолиевой кислоты в момент времени, максимально приближенный к T<sub>max</sub>. Таким образом, обеспечивалась доставка фолиевой кислоты в сравнительно малом объеме



пищи, чтобы обеспечить легкость потребления в течение 10-минутного периода, особенно для пожилых участников исследования.

В сравнении с предложением FDA обогащать продукты из расчета 1,4 мг фолиевой кислоты/кг (из расчета доставки 30 мкг фолиевой кислоты с одним кусочком), количества витамина, использованные в эксперименте, например, при пересчете на 1 г хлеба, были значительно выше. Учитывая такое избыточное обогащение, мы, тем не менее, стремились обеспечить разовое «болюсное» введение фолиевой кислоты с изотоническим раствором, хлебом и молоком в дозе > 200 мкг для того, чтобы получить определяемые концентрации фолиевой кислоты в сыворотке. Аналогичные пороговые дозы для изотонического раствора и хлеба указывают на более высокую биодоступность фолатов в хлебе, чем отмечалось ранее [26]. По образцам участников этих экспериментов не было выявлено никаких значимых дозозависимых эффектов, влияющих на концентрацию фолиевой кислоты, за исключением обогащения хлеба самой высокой дозой (табл. 3).

Имеет ли значение частота выявления неметаболизированной фолиевой кислоты в сыворотке у относительно небольшого ко-

личества обследованных в этой работе людей для разрешения текущего спора вокруг программы обогащения продуктов в США? В Соединенных Штатах нецелевые группы, потребляющие много хлеба, например 11–18-летние юноши, относящиеся к 95-му перцентилю потребления, в настоящее время получают ≈ 800 мкг фолатов в день [5]. Программа обогащения с применением дозы 1,4 мг/кг будет сопровождаться увеличением этого количества до ≈ 960 мкг/сут; в случае повышения дозы до 3,5 мг/кг муки (согласно рекомендациям CDC) [7] суточное потребление возрастет до 1200 мкг/сут. Это же может произойти у детей в возрасте 4–10 лет и мужчин старше 51 года, для которых также характерен высокий уровень потребления зерновых. Однако расчетные показатели повышенного потребления фолиевой кислоты делают маловероятным повторное появление в сыворотке неметаболизированной фолиевой кислоты, поскольку обогащенные продукты, вероятно, будут потребляться более чем за один прием в день. Соблюдение рекомендованного FDA «безопасного уровня потребления», составляющего 1000 мкг/сут фолатов за счет комбинации пищевых фолатов и добавок, может

привести к появлению неметаболизированной фолиевой кислоты в сыворотке, поскольку основная доля этого количества, вероятно, будет поступать в организм в виде дополнительной фолиевой кислоты. Исходя из современных данных, соблюдение рекомендаций женщинами детородного возраста, предусматривающих прием 400 мкг/день с целью профилактики развития у плода дефектов нервной трубки во время беременности, наиболее вероятно приведет у многих потребителей к повторным эпизодам появления фолиевой кислоты в кровотоке матери и плода.

По результатам проведенного исследования, с одной стороны, дополнительный прием фолиевой кислоты (в таблетках) оказывается единственным эффективным способом профилактики дефектов нервной трубки [27], с другой – такой прием может приводить к появлению неметаболизированной фолиевой кислоты в кровотоке. Программа обогащения продуктов, подобная той, которая реализуется правительством США, может решить эту дилемму, обеспечивая доставку фолиевой кислоты подавляющему большинству населения по схеме с расчетной суточной дозой, которая не превышает пороговое значение. ❧

## Литература

1. Scott J.M., Weir D.G., Kirke P.N. Folate and neural tube defects // *Folate in Health and Disease* / ed. by L. Bailey. N.Y.: Marcel Dekker, 1995. P. 329–360.
2. Lucock M., Wild J., Smithells R. et al. Biotransformation of pteroylmonoglutamic acid during absorption: implications of Michaelis-Menten kinetics // *Eur. J. Clin. Nutr.* 1989. Vol. 43. № 9. P. 631–635.
3. Kelly P., McPartlin J., Scott J. A combined high-performance liquid chromatographic-microbiological assay for serum folic acid // *Anal. Biochem.* 1996. Vol. 238. № 2. P. 179–183.
4. Gaull G.E., Testa C.A., Thomas P.R. et al. Fortification of the food supply with folic acid to prevent neural tube defects is not yet warranted // *J. Nutr.* 1996. Vol. 126. № 3. P. 773S–780S.
5. Crane N.T., Wilson D.B., Cook A. et al. Evaluating food fortification options: general principles revisited with folic acid // *Am. J. Public Health.* 1995. Vol. 85. № 5. P. 660–666.
6. Food labeling: health claims and label statements; folate and neural tube defects / Food and Drug Administration // *Fed. Regist.* 1996. Vol. 61. № 44. P. 8752–8781.
7. Oakley G.P., Adams M.J., Dickinson C.M. More folic acid for everyone, now // *J. Nutr.* 1996. Vol. 126. № 3. P. 751S–755S.
8. O'Broin S., Kelleher B. Microbiological assay on microtitre plates of folate in serum and red cells // *J. Clin. Pathol.* 1992. Vol. 45. № 4. P. 344–347.
9. Scott J., Weir D.C., Kirke P.N. Prevention of neural tube defects with folic acid a success but... // *QJM.* 1994. Vol. 87. № 12. P. 705–707.
10. Butterworth C.E. Jr., Tamura T. Folic acid safety and toxicity: a brief review // *Am. J. Clin. Nutr.* 1989. Vol. 50. № 2. P. 353–359.
11. Dickinson C.J. Does folic acid harm people with vitamin B12 deficiency? // *QJM.* 1995. Vol. 88. № 5. P. 357–364.
12. Bäckman N., Holm A.K., Hånström L. et al. Folate treatment of diphenylhydantoin-induced gingival hyperplasia // *Scand. J. Dent. Res.* 1989. Vol. 97. № 3. P. 222–232.



13. Brown R.S., Di Stanislao P.T., Beaver W.T. et al. The administration of folic acid to institutionalised epileptic adults with phenytoin-induced gingival hyperplasia. A double-blind, randomised, placebo-controlled, parallel study // Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. 1991. Vol. 71. № 5. P. 565–568.
14. Morgan S.L., Baggott J.E. Folate antagonists in nonneoplastic disease: proposed mechanisms of efficacy and toxicity // Folate in Health and Disease / ed. by L. Bailey. N.Y.: Marcel Dekker, 1995. P. 405–433.
15. Albrecht A.M., Biedler J.L. Acquired resistance of tumor cells to folate antagonists // Folate antagonists as therapeutic agents. Vol. 1. Biochemistry, molecular actions and synthetic design / ed. by F.M. Sirotnak, J.J. Burchall, W.D. Ensminger et al. N.Y.: Academic Press, 1984. P. 317–347.
16. Mason J.B. Intestinal transport of monoglutamyl folates in mammalian systems // Folic acid metabolism in health and disease / ed. by M.F. Picciano, E.L.R. Stokstad, I.F. Gregory. N.Y.: Wiley-Liss, 1990. P. 47–64.
17. Cichowicz D.J., Shane B. Mammalian folylpoly-gamma-glutamate synthetase. 2. Substrate specificity and kinetic properties // Biochemistry. 1987. Vol. 26. № 2. P. 513–521.
18. Tisman G., Herbert V. B12 dependence of cell uptake of serum folate: explanation for high serum folate and cell folate depletion in B12 deficiency // Blood. 1973. Vol. 41. № 3. P. 465–469.
19. Metz J., Kelly A., Swett V.C. et al. Deranged DNA synthesis by bone marrow from vitamin B12-deficient humans // Br. J. Haematol. 1968. Vol. 14. № 6. P. 575–592.
20. Ganeshaguru K., Hoffbrand A.V. The effect of deoxyuridine, vitamin B12, folate and alcohol on the uptake of thymidine and on the deoxynucleoside triphosphate concentrations in normal and megaloblastic cells // Br. J. Haematol. 1978. Vol. 40. № 1. P. 29–41.
21. Zittoun J., Marquet J., Zittoun R. Effect of folate and cobalamin compounds on the deoxyuridine suppression test in vitamin B12 and folate deficiency // Blood. 1978. Vol. 51. № 1. P. 119–128.
22. Scott J.M., Dinn J.J., Wilson P. et al. Pathogenesis of subacute combined degeneration: a result of methyl group deficiency // Lancet. 1981. Vol. 2. № 8242. P. 334–337.
23. Chanarin I. The megaloblastic anaemias. 2<sup>nd</sup> ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1979. 783 p.
24. Keagy P.M., Shane B., Oace S.M. Folate bioavailability in humans: effects of wheat bran and beans // Am. J. Clin. Nutr. 1988. Vol. 47. № 1. P. 80–88.
25. Bailey L.B., Barton L., Hillier S. Bioavailability of mono and polyglutamyl folate in human subjects // Nutr. Rep. Inter. 1988. Vol. 38. P. 509–518.
26. Colman N., Green R., Metz J. Prevention of folate deficiency by food fortification. II. Absorption of folic acid from staple foods // Am. J. Clin. Nutr. 1975. Vol. 28. № 5. P. 459–464.
27. Cuskelly G.J., McNulty H., Scott J.M. Effect of increasing dietary folate on red-cell folate: complications for prevention of neural tube defects // Lancet. 1996. Vol. 347. № 9002. P. 657–659.

гинекология

### Unmetabolized folic acid in serum: acute studies in subjects consuming fortified food and supplements

P. Kelly<sup>1</sup>, J. McPartlin<sup>1</sup>, M. Goggins<sup>2</sup>, D.G. Weir<sup>1</sup>, J.M. Scott<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Trinity College, Dublin, Ireland

<sup>2</sup> The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, USA

Contact person: Joseph McPartlin, JMCPTLN@TCD.ie

*Periconceptual consumption of folic acid has been shown to decrease the incidence of neural tube defects. The strategy of universal fortification of staple foodstuffs with folic acid presents the possibility of life-long exposure to unmetabolized folic acid. Chief among the risks of exposure to folic acid in the circulation is that of masking the diagnosis of cobalamin deficiency in pernicious anemia and the progression of neurologic disease. Other effects are unknown. For instance, the effect of in vivo chronic exposure of adult and fetal cells to the synthetic form of the vitamin has never been investigated at the population level. This study examined the acute appearance of unmetabolized folic acid in serum in response to the consumption of some fortified foodstuffs by young and elderly volunteers. Subjects on a 5-day regimen of fortified ready-to-eat-cereal and bread in addition to their normal diet had a threshold intake of 266 µg folic acid per meal at which unaltered folic acid appeared in the serum. Subjects given folic acid in either isotonic saline, milk, or white bread also had a threshold > 200 µg. From patterns of food consumption in the United States, the implementation of flour fortification at 1,4 mg/kg is unlikely to lead to folic acid appearance in serum, assuming that consumption is spread throughout the day. Increasing this level of fortification, however, as has been advocated by some agencies, may result in the repeated appearance of folic acid in serum over many years, particularly in consumers in nontargeted populations of large amounts of fortified foods. The “safe level of intake” of 1 mg folate/day set by the US Food and Drug Administration may cause a serum folic acid effect. Furthermore, a repeated serum folic acid response is likely to be found in many women complying with the advice to take 400 µg folic acid/day to prevent the occurrence of neural tube defects.*

**Key words:** food fortification, supplements, folic acid, serum, safety, metabolism threshold, humans, neural tube, defects