

Микаелян Н.П., Нгуен З.Х., Комаров О.С., Микаелян К.А.

ПАРАЛЛЕЛЬНОЕ СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТАБОЛИЗМА ЖИРНЫХ КИСЛОТ В ЭРИТРОЦИТАХ И ДРУГИХ ТКАНЯХ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова»
Минздрава России, 117997, г. Москва

♦ Параллельное исследование влияния стрептозотоцинового сахарного диабета (СД) на уровень липидов и состав жирных кислот (ЖК) в крови, в гомогенатах кожи, печени и мышечной ткани в условиях оксидативного стресса показало, что у крыс уже в ранние сроки развития диабета, наряду с гипертриглицеридемией и гиперхолестеринемией, отмечаются значительные изменения в составе ЖК крови и гомогенатов изучаемых тканей, которые сопровождаются перекисным окислением липидов и снижением активности ферментов-антиоксидантов, а также уменьшением степени утилизации глюкозы эритроцитами. При экспериментальном СД значительное повышение уровня насыщенных ЖК, особенно пальмитиновой ЖК, приводит к снижению уровня мононенасыщенных ЖК (за счет олеиновой ЖК), что существенно отличается от соответствующего спектра у больных диабетом. Результаты исследования свидетельствуют также о том, что уже на ранних стадиях развития СД изменения в пуле ЖК эритроцитов и гомогенатов печени, кожи и сердечной мышцы аналогичны (с небольшими различиями), и во всех изучаемых тканях нарушение метаболизма ЖК имеет атеросклеротическую направленность.

Ключевые слова: сахарный диабет; перекисное окисление липидов; оксидативный стресс; мононенасыщенные жирные кислоты.

Для цитирования: Микаелян Н.П., Нгуен З.Х., Комаров О.С., Микаелян К.А. Параллельное сравнительное исследование метаболизма жирных кислот в эритроцитах и других тканях при экспериментальном сахарном диабете. *Российский медицинский журнал*. 2017; 23(1): 27—30. DOI <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2106-2017-23-1-27-30>

Для корреспонденции: Микаелян Нина Погосовна, профессор кафедры биохимии и молекулярной биологии лечебного факультета ГОУ ВПО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова», 117997, г. Москва, E-mail: ninmik@yandex.ru

Mikaelyan N.P., Nguen Z.Kh., Komarov O.S., Mikaelyan K.A.

THE PARALLEL COMPARATIVE STUDY OF METABOLISM OF FATTY ACIDS IN ERYTHROCYTES AND OTHER TISSUES UNDER EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS

The N.I. Pirogov Russian national research medical university Minzdrav of Russia, 117997, Moscow, Russian Federation

♦ The parallel study of impact of Streptozotocin diabetes mellitus on level of lipids and content of fatty acids in blood, in homogenates of skin, liver and muscular tissue in conditions of oxidative stress demonstrated that in rats at early period of development of diabetes mellitus alongside with hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia, significant alterations are observed in content of fatty acids of blood and homogenates of analyzed tissues. The alterations are accompanied with peroxidation of lipids and decreasing of activity of enzymes-antioxidants and also decreasing of degree of utilization of glucose by erythrocytes. Under experimental diabetes mellitus significant increasing of saturated fatty acids, especially palmitic fatty acid, results in decreasing of level of mono unsaturated fatty acids (at the expense of oleic fatty acids) that significantly differs of corresponding spectrum in patients with diabetes mellitus. The results of study also testify that already at early stages of development of diabetes mellitus alterations in pool of fatty acids of erythrocytes and homogenates of liver, skin and cardiac muscle similar (with slightly differences) and in all analyzed tissues disorders of fatty acids metabolism are characterized by atherosclerotic direction.

Keywords: diabetes mellitus; peroxidation of lipids; oxidative stress; mono unsaturated fatty acids

For citation: Mikaelyan N.P., Nguen Z.Kh., Komarov O.S., Mikaelyan K.A. The parallel comparative study of metabolism of fatty acids in erythrocytes and other tissues under experimental diabetes mellitus. *Rossiiskii meditsinskii zhurnal (Medical Journal of the Russian Federation, Russian journal)*. 2017; 23(1): 27—30. (In Russ.) DOI <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2107-2016-23-1-27-30>

For correspondence: Nina P. Mikaelyan, professor, of chair of biochemistry and molecular biology of medical facultet the N.I. Pirogov Russian national research medical university Minzdrav of Russia, 117997 Moscow, Russian Federation, E-mail: ninmik@yandex.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Received 05.06.16
Accepted 21.06.16

По данным ВОЗ, на сегодняшний день в мире насчитывается 347 млн больных сахарным диабетом (СД). Все чаще СД встречается у детей в младшем школьном и препубертатном возрасте. Это оправдывает необходимость дальнейшего изучения механизмов развития данной патологии, поиска новых решений в диагностике, коррекции и лечении СД [1—3]. Широкое применение высококачественных препаратов инсулина и других сахароснижающих препаратов, существенно продлевающих жизнь больных, не обеспечивает полной компенсации нарушенного обмена веществ и не предотвращает развитие многочисленных осложнений, среди которых основное место занимают поражения сердечно-сосудистой системы [4—6]. Многочисленные исследования в этой

области свидетельствуют о том, что повреждающее действие гипергликемии на сосудистую стенку опосредуется свободными радикалами. Имеющиеся в литературе данные, полученные при изучении процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и состояния антиоксидантной системы (АОС) у больных СД, очень противоречивы и касаются лишь некоторых показателей системы ПОЛ — АОС [7]. Многие вопросы, связанные с особенностями нарушения липидного обмена, в том числе обмена жирных кислот (ЖК) в эритроцитах, печени, сердечной мышце и коже у больных СД, остаются нерешенными.

Цель настоящей работы — параллельное сравнительное исследование патогенетических механизмов нарушения метаболизма ЖК в эритроцитах и других

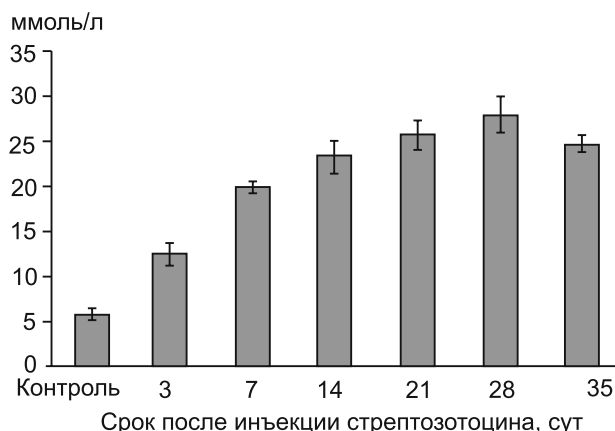


Рис. 1. Динамика концентрации глюкозы после введения стрептозотоцина крысам.

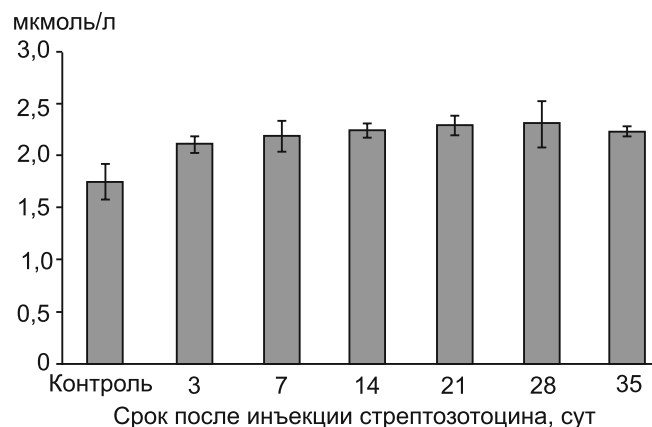


Рис. 2. Концентрация МДА в эритроцитах крыс ($M \pm SD$).

тканях и развития окислительного стресса при СД в эксперименте.

Материал и методы

Эксперименты проведены на 80 крысах-самцах линии Вистар одной возрастной группы (10—14 мес) массой 210—250 г. СД вызывали путем однократного внутривенного введения 2,5% раствора стрептозотоцина (производство фирмы Sigma) в дозе 60 мг на 1 кг массы тела животного на фоне 24—48-часового голодания. Кровь у животных брали до эксперимента, через 3; 7; 14; 21; 28 и 35 дней после введения стрептозотоцина. Контрольным животным вводили эквивалентное количество физиологического раствора.

Об активности процессов ПОЛ в плазме крови, в мембране эритроцитов и гомогенатах печени (ГП), сердечной мышцы и кожи судили по содержанию ТБК-активных продуктов и малонового диальдегида (МДА), для определения концентрации которых использовали метод К. Yagi [8]. Активность каталазы (Кт) в крови определяли по методу М. Королук и соавт. [9].

Материалом для исследования ЖК служили эритроциты (Эр), гомогенаты мышц сердца, печени и кожи. Экстракцию липидов из гомогенатов проводили по методу J. Folch и соавт. [10], после чего осуществляли гидролиз и метилирование ЖК методом Kenichi Ichihara и Yumeto Fukubayashi [11]. Применяли метод газожидкостной хроматографии с масс-спектрометрией TraceGC Ultra IQ 900 (ThermoScientific, США, 2009). Прибор калибровали стандартными смесями метиловых эфиров ЖК фирмы Sigma (США). Обсчет и идентификацию пиков проводили с помощью программно-аппаратного комплекса «Analytica for Windows» с использованием IBM Pentium IV 1800. Программное обеспечение для обработки данных осуществлялось: Xcalibur (Thermo); спектральные библиотеки: Mainlib; Microsoft Excel 2010. Цифровой материал обрабатывали методом вариационной статистики с использованием *t*-критерия Стьюдента.

Результаты

Исследование уровня глюкозы в крови у крыс показало, что на 3-и сутки после введения стрептозотоцина концентрация глюкозы достоверно увеличилась в 3,2 раза, а в моче — в 5,7 раза по сравнению с контрольной группой животных. В течение последующих дней наблюдения количество глюкозы в крови крыс этой группы оставалось стабильно высоким (рис. 1).

Параллельно с гипергликемией, гиперхолестеринемией и гипертриглицеридемией в зависимости от длительности времени после введения стрептозотоцина [12] возрастала и концентрация МДА и других ТБК-активных продуктов во всех изучаемых нами тканях, достигая высоких значений на 28-е сутки после введения стрептозотоцина (рис. 2, 3).

Повышение активности ТБК-активных метаболитов было особенно значимым в гомогенатах печени и сердечной ткани на 28-е сутки после введения стрептозотоцина ($p < 0,05$). Как видно на рис. 3, концентрация ТБК-активных веществ во всех изучаемых тканях на 28-е сутки введения стрептозотоцина возрастает более чем в 2 раза (в печени до $0,254 \pm 0,012$ нмоль/мг при $0,123 \pm 0,001$ нмоль/мг в контроле и в коже до $0,141 \pm 0,002$ нмоль/мг по сравнению с контрольным уровнем $0,062 \pm 0,003$ нмоль/мг).

Наряду с увеличением интенсивности свободнорадикального окисления (СРО) липидов и нарушением структуры и свойств эритроцитарной мембраны при стрептозотоциновом диабете наблюдаются изменения в системе антиоксидантной защиты. Так, показано, что в крови у крыс выявлено повышение активности Кт (рис. 4). Возрастание активности Кт в эритроцитах можно назвать компенсаторной реакцией на увеличение интенсивности СРО при экспериментальном СД, в то время когда другие компоненты АОС оказываются значительно чувствительнее к усилению окислительных процессов в клетке, что проявляется снижением актив-

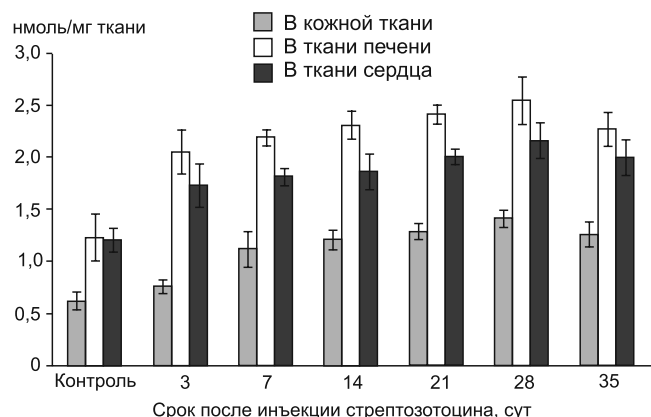


Рис. 3. Концентрация ТБК-активных продуктов в ткани кожи, печени и сердечной мышцы ($M \pm SD$).

ности других исследованных нами ферментов-антиоксидантов (СОД, ГПО) [12].

При определении состава ЖК на 7—10-е сутки после введения стрептозотоцина (табл. 1) установлено, что в сердечной мышце и коже возрастает суммарное содержание НЖК за счет пальмитиновой, стеариновой и арахидиновой ЖК. Коэффициент НЖК/ННЖК особенно значительно возрастает через 28 дней после введения препарата. В течение всего периода наблюдения отмечается снижение уровня ω -7 и ω -9 ЖК. Снижение уровня ω -7 (пальмитиновой и пальмитолеиновой кислот) свидетельствует о возрастании уровня триглицеридов (ТГ). При этом между пальмитиновой кислотой и ТГ отмечается прямая корреляция ($r = +0,87$), между уровнем глюкозы в крови и пальмитиновой кислоты отмечается также прямая корреляция ($r = +0,63$). Увеличение концентрации ω -9 ЖК связано с увеличением содержания олеиновой кислоты. Аналогичная картина отмечается и в других изучаемых нами тканях: на 28-й день наблюдения после введения препарата достоверно повышается уровень всех НЖК, особенно

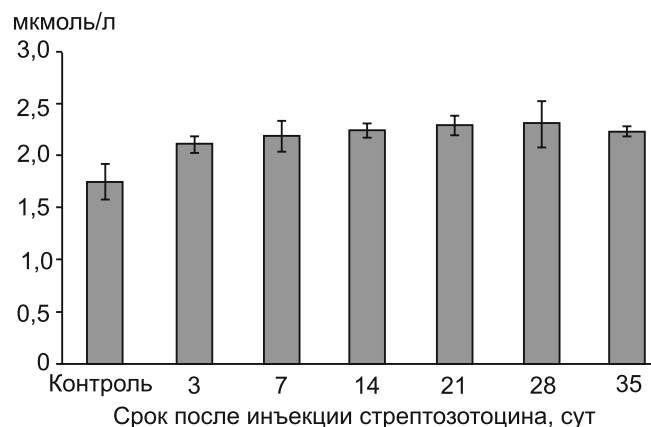


Рис. 4. Значение активности каталазы в крови у крыс ($M \pm SD$).

значительно возрастают концентрации миристиновой и пальмитиновой кислот. Снижение содержания полиненасыщенных жирных кислот (ПННЖК) ω -3 и ω -7 в мышечной ткани сопровождается отрицательной корреляцией

Таблица 1

Уровень ЖК в гомогенатах сердечной мышцы и кожи у крыс на 7—10-й день после введения стрептозотоцина (в % от суммы ЖК; $M \pm SD$)

ЖК	Гомогенаты сердца		Гомогенаты кожи	
	контроль	опыт	контроль	опыт
20:5 (ЭПК))	0,150 ± 0,068	0,250 ± 0,016	0,170 ± 0,020	0,219 ± 0,001
22:6 (ДГК)	2,716 ± 0,176	2,874 ± 0,292	0,853 ± 0,111	0,620 ± 0,010
18:2 (линолевая)	16,354 ± 0,237	20,890 ± 1,057*	34,742 ± 0,040	34,926 ± 0,680
20:3 (дигомо-γ-линоленовая)	0,162 ± 0,026	0,195 ± 0,009	0,155 ± 0,001	0,118 ± 0,001
20:4 (арахидиновая)	17,980 ± 0,320	11,734 ± 0,891*	0,462 ± 0,021	0,206 ± 0,004
Σ НЖК	42,172 ± 0,61	46,145 ± 1,166	28,918 ± 0,996	32,898 ± 2,030
Σ ННЖК	57,828 ± 0,61	53,855 ± 1,166	71,082 ± 0,996	67,102 ± 2,030
НЖК/ННЖК	0,730 ± 0,018	0,858 ± 0,042	0,407 ± 0,020	0,491 ± 0,045
Σω3	3,279 ± 0,362	3,447 ± 0,123*	1,600 ± 0,025	1,427 ± 0,203
Σω6	34,496 ± 0,110	32,818 ± 2,916	35,358 ± 0,051	35,250 ± 0,667
Σω7	1,385 ± 0,305	1,213 ± 0,021	4,191 ± 0,005	3,099 ± 0,106*
Σω9	18,507 ± 0,330	16,232 ± 1,045	29,804 ± 0,293	27,238 ± 1,065

Примечание. * — различия достоверны по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$); НЖК — насыщенные ЖК; ННЖК — ненасыщенные ЖК; Σ — сумма. Во всех группах было по 10 животных.

Таблица 2

Уровень ЖК в эритроцитах и гомогенатах печеночной ткани у крыс со стрептозотоциновым диабетом (в % от суммы ЖК, $M \pm SD$)

ЖК	Эритроциты		Гомогенаты печени	
	контроль	опыт	контроль	опыт
20:5 (ЭПК)	1,003 ± 0,020	1,32 ± 0,03*	0,270 ± 0,047	0,532 ± 0,44*
22:6 (ДГК)	4,436 ± 0,511	4,75 ± 0,23*	4,84 ± 0,83	5,950 ± 0,080*
18:2 (линолевая)	14,221 ± 0,140	13,81 ± 0,49*	20,46 ± 0,25	21,26 ± 0,27*
20:3 (дигомо-γ-линоленовая)	0,30 ± 0,02	0,75 ± 0,21*	0,38 ± 0,01	0,43 ± 0,09
20:4 (арахидиновая)	13,746 ± 0,479	11,09 ± 0,091*	19,27 ± 1,08	17,51 ± 0,96
Σ НЖК	43,115 ± 1,830	49,98 ± 2,12	36,67 ± 2,31	39,94 ± 2,78
Σ ННЖК	43,116 ± 1,910	54,36 ± 0,93	36,67 ± 0,93	39,91 ± 0,87
НЖК/ННЖК	1,010	0,91	1,0	1,0
Σω3	5,67 ± 0,41	6,28 ± 0,53*	5,49 ± 0,95	6,91 ± 0,05*
Σω6	28,68 ± 1,35	25,94 ± 0,79*	34,88 ± 0,91	38,92 ± 0,66
Σω7	1,69 ± 0,05	1,23 ± 0,08*	1,85 ± 0,01	0,81 ± 0,06*
Σω9	20,983 ± 1,330	12,19 ± 0,45	16,31 ± 0,93	13,38 ± 0,06

Примечание. * — различия достоверны по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$); Σ — сумма.

между уровнем холестерина и семейством ПННЖК ω -3 ($r = -0,56$), а также между уровнем ТГ и ПННЖК ω -3 ($r = -0,61$).

В пуле НЖК максимальное повышение уровня отдельных фракций в эритроцитах (табл. 2) отмечается в опытной группе крыс на 7-е сутки после введения стрептозотоцина: миристиновой (С14:0) кислоты — на 56%, пальмитиновой (С16:0) — на 45,8%, стеариновой (С18:0) — на 24,8% по отношению к контрольной группе. Содержание мононасыщенных жирных кислот (МНЖК) пальмитоолевой и миристоолевой было низким. Образование МНЖК из насыщенных катализируется 9-десатуразой. При ее гиперэкспрессии происходит возрастание уровня пальмитиновой кислоты относительно стеариновой. Свидетельством повышенной активности синтазы ЖК в эритроцитах в опытной группе может являться тот факт, что у крыс этой группы уровень пальмитиновой кислоты снижен на 15,7% ($p < 0,05$) в сравнении с контролем, а суммарное содержание стеариновой и арахисовой — на 38,3% ($p < 0,05$). В отличие от других НЖК уровень миристиновой кислоты в эритроцитах животных опытной группы не снижается, а наоборот, имеет тенденцию к росту ($p = 0,2$), по-видимому, в связи с тем, что миристиновая ЖК в основном включается в клеточные ТГ [6], что может привести к гипертриглицеридемии. Уровень олеиновой ЖК в Эр и ГП снижается в $1,72 \pm 0,09$ и $1,2 \pm 0,03$ раза соответственно ($p < 0,05$). Между тем как в Эр, так и в ГП крыс достоверно повышается уровень насыщенной пальмитиновой ЖК и снижается уровень МНЖК (за счет олеиновой кислоты). Несмотря на то что концентрация ЭПК и ДГК достоверно повышается, при этом значительно снижается суммарное содержание ω -3 ЖК за счет альфа-линолевой кислоты. Сумма ω -6 жирных кислот достоверно снижается не только в Эр, но и в ГП. Суммарное содержание ЖК в семействе ω -9 в Эр на 7-е сутки после введения стрептозотоцина также достоверно снижается.

Таким образом, при СД в эксперименте уже в ранние сроки развития патологии наряду с гипертриглицеридемией и гиперхолестеринемией отмечаются значительные изменения в жирнокислотном составе крови и в гомогенатах изучаемых тканей, что сопровождается ПОЛ и снижением активности ферментов-антиоксидантов, а также снижением степени утилизации глюкозы Эр. При экспериментальном СД повышение уровня насыщенной пальмитиновой ЖК приводит к снижению уровня МНЖК (за счет олеиновой ЖК), что существенно отличается от соответствующего спектра у больных СД. Полученные результаты исследования убедительно свидетельствуют о том, что уже на ранних стадиях развития СД изменения в пуле ЖК эритроцитов и гомогенатов печени, кожи и сердечной мышцы аналогичные (с небольшими различиями) и что во всех изучаемых тканях нарушение метаболизма ЖК имеет атеросклеротическую направленность.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

(п. п. 1, 5—8, 10—11 см. References)

- Кроненберг Г.М., Мелмед Ш., Полонски К.С., Ларсен П.Р. *Эндокринология по Вильямсу. Сахарный диабет и нарушения углеводного обмена*. Перевод с английского. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2010.
- Кураева Т.Л. Метформин в лечении сахарного диабета 2 типа у детей и подростков. *Эффективная фармакотерапия*. 2011; (26): 28—33.
- Петунина Н.А., Трухина Л.В., Синицына Е.И., Шестакова М.В. Глюкагон и альфа-клетки — новая терапевтическая мишень в лечении сахарного диабета. *Сахарный диабет*. 2013; (3): 35—40.
- Корольков М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. Метод определения активности каталазы. *Лабораторное дело*. 1988; (1): 16—9.
- Микаелян Н.П., Нгуен З.Х., Терентьев А.А. Метаболические нарушения в мембранах эритроцитов и гомогенатах печеночной ткани при сахарном диабете в эксперименте. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2015; (2): 154—8.

REFERENCES

- Inzucchi S.E., Bergenstal R.M., Buse J.B., Diamant M., Ferrannini E., Nauck M. et al. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a patient-centered approach: position statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care*. 2012; 35(6): 1364—79.
- Kronenberg H.M., Melmed Sh., Polonsky K.S., Larsen P.R. *Williams Textbook of Endocrinology*. 11th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2008.
- Kuraeva T.L. Metformin in the treatment of type 2 diabetes in children and adolescents. *Effektivnaya farmakoterapiya*. 2011; (26): 28—33. (in Russian)
- Petunina N.A., Trukhina L.V., Sinitsyna E.I., Shestakova M.V. Glucagon and alpha cells -a new therapeutic target in the treatment of diabetes. *Sakharnyy diabet*. 2013; (3): 35—40. (in Russian)
- Harris W.S., Miller M., Tighe A.P., Davidson M.H., Schaefer E.J. Omega-3 fatty acids and coronary heart disease risk: clinical and mechanistic perspectives. *Atherosclerosis*. 2008; 197: 12—24.
- Ziegler D., Sohr C.G., Nourooz-Zadeh J. Oxidative stress and antioxidant defense in relation to the severity of diabetic polyneuropathy and cardiovascular autonomic neuropathy. *Diabetes Care*. 2004; 27(9): 2178—83.
- Rodríguez-Carrizalez A.D., Castellanos-González J.A., Martínez-Romero E.C., Miller-Arrevallo G., Villa-Hernández D., Hernández-Godínez P.P. et al. Oxidants, antioxidants and mitochondrial function in non-proliferative diabetic retinopathy. *J. Diabetes*. 2014; 6(2): 167—75.
- Yagi K. A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem. Med.* 1976; 15(2): 212—6.
- Korolyuk M.A., Ivanova L.I., Mayorova I.G. The method for determining the activity of catalase. *Laboratornoe delo*. 1988; (1): 16—9. (in Russian)
- Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 1957; 226(1): 497—509.
- Ichihara K., Fukubayashi Y. Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography. *J. Lipid. Res.* 2010; 51(3): 635—40.
- Mikaelyan N.P., Nguen Z.Kh., Terent'ev A.A. Metabolic disturbances in the membranes of erythrocytes and tissue homogenates of liver in diabetes experimentally. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2015; (2): 154—8. (in Russian)

Поступила 05.06.16
Принята к печати 21.06.16