

УДК 612.019+616.13.002.2+577.125.3

АНТИАТЕРОГЕННЫЙ ХАРАКТЕР СИНТЕЗА ЖИРНЫХ КИСЛОТ У КРЫС – ОДНА ИЗ ВОЗМОЖНЫХ ПРИЧИН ИХ УСТОЙЧИВОСТИ К АТЕРОСКЛЕРОЗУ

А. Н. ОСИПЕНКО

Заведующий Центральной учебно-исследовательской лабораторией
Могилевский государственный университет имени А. А. Кулешова

В работе представлены экспериментальные данные, указывающие на то, что одной из причин высокой, в сравнении с человеком, устойчивости крыс к атеросклерозу может быть разница в активности ряда ферментов, участвующих в элонгации и десатурации жирных кислот.

Ключевые слова: атеросклероз, крысы, жирные кислоты, десатураза жирных кислот, элонгаза жирных кислот.

Введение

В настоящее время лабораторные животные, и в особенности крысы – играют важную роль в качестве модельных организмов при проведении медико-биологических исследований. Экспериментальные модели с использованием крыс применяются при изучении механизмов развития патофизиологических процессов и при оценке влияния на организм негативных факторов среды, также они используются на этапе доклинического тестирования лекарственных препаратов. Тем не менее, у крысы и человека, несмотря на сходство в протекании физиологических процессов в организме, существуют различия в метаболизме, что, с одной стороны, отражается на биохимическом составе тканей, а с другой – на восприимчивости к развитию различных заболеваний. Наиболее известным в этом отношении является тот факт, что в отличие от человека крысы устойчивы к развитию атеросклероза. Только многократное и противоестественное для этих животных увеличение содержания холестерина в рационе приводит к формированию у них артериальных поражений, сходных с атеросклеротическими изменениями, наблюдаемыми у человека [1; 2; 3; 4]. Выяснение природы устойчивости крыс к развитию атеросклероза может помочь при создании их генетических линий с более близкими к человеческому организму свойствами, а самое главное, лучше понять причины восприимчивости самого человека к этой патологии. Решению данной задачи может помочь сравнительное исследование состава жирных кислот (ЖК) тканей человека и крыс с целью выяснения особенностей метаболизма ЖК этих животных.

Основная часть

Методы исследования. Проводился анализ состава жирных кислот (определение процентного содержания отдельных ЖК в их общей сумме) эритроцитов и плазмы крови у 20 белых лабораторных крыс. У 4 крыс был проанализирован состав ЖК в эластических артериях (брюшных аортах). Также был изучен состав ЖК эритроцитов и плазмы крови 17 здоровых людей (38,4 ± 3,3 лет) и соответствующий состав фрагментов артерий эластического типа (общих сонных артерий) 9 человек (56,3 ± 1,5 лет). Все исследованные артериальные сосуды не имели признаков атеросклероза.

Преаналитический этап состоял в разделении клеточного компонента и плазмы крови путем центрифугирования. Затем эритроциты дважды отмывали в сбалансированном по pH изотоническом растворе. Далее проводили дериватизацию анализируемых соединений плазмы и эритроцитов крови в 1,5 М растворе HCl в этаноле при температуре 60°C в течение 1 часа. Экстракцию полученных дериватов из реакционной смеси осуществляли с помощью гексана. Далее проводился анализ жирных кислот, которые присутствовали в гексановых экстрактах в виде этиловых эфиров. Для этого использовался метод газожидкостной хроматографии с регистрацией определяемых химических соединений пламенно-ионизационными детектором [5].

Производные жирных кислот артериальных сосудов получали после извлечения липидов этанолом из гомогенизированных образцов. Гомогенизацию фрагментов сосудов осуществляли до получения однородной массы. Для этого их растирали фарфоровым пестиком в ступках с толченым стеклом, добавляя небольшими количествами этанол. Затем аналогичным образом использовали кислотный этанол и экстракцию этиловых эфиров ЖК гексаном.

Измерения проводились на газовых хроматографах ГХ-1000, ЦВЕТ-800 (Россия). Разделение анализируемых соединений осуществлялось с использованием капиллярной колонки длиной 60 м и внутренним диаметром 0,56 мм, с силиконовой неподвижной фазой SE-30 (толщина пленки сорбента 0,25 мкм). В качестве газа-носителя использовался азот. Идентификация каждой жирной кислоты осуществлялась по времени ее удерживания в хроматографической колонке. Характерные для разных ЖК времена удерживания определялись с помощью смесей жирных кислот с известным процентным содержанием каждой кислоты. Кроме того, идентификация ЖК осуществлялась с помощью метода хромато-масс-спектрометрии. В работе использовался газовый хроматограф / масс-спектрометр Thermo Scientific DSQ II (США), оснащенный аналогичной хроматографической капиллярной колонкой. Более подробно процесс хроматографического анализа ЖК описан в статье [6].

Количественная оценка содержания отдельных жирных кислот производилась методом нормализации. Площадь пика, соответствующего определенной кислоте, определялась в процентном отношении от общей площади пиков ЖК. При этом доля пика отдельной жирной кислоты от общей площади пиков ЖК соответствовала ее массовому процентному содержанию в общей сумме жирных кислот ($C_{12:0}$ - $C_{22:6}$).

Полученные данные представлены в виде средних для сравниваемых групп и соответствующих значений доверительного интервала с доверительной вероятностью 95% (нормальность распределения подтверждалась по критерию Колмогорова-Смирнова), а также путем использования медианы (Me) и интерквартильного размаха в формате Me [LQ; UQ], где LQ – нижний квартиль, UQ – верхний квартиль медианы. Оценка достоверности различий между выборками осуществлялась с использованием U-критерия Манна-Уитни, который позволяет оперировать выборками с небольшим количеством наблюдений [7]. Изменения считались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Состав ЖК крови и артерий крыс заметно отличается от соответствующего состава у человека. При этом особенности рациона не оказывают определяющего влияния на видовые характеристики состава ЖК тканей организма. Это связано с тем, что в стенке кишечника синтезируются жиры во многом специфичные для человека или другого вида, и качественно отличающиеся от пищевого жира, так как при этом используется значительное количество жирных кислот, образующихся в организме [8]. Главным отличием состава ЖК артерий эластического типа крыс от соответствующего состава эластических артерий человека является существенно более высокая доля насыщенной пальмитиновой ($C_{16:0}$) кислоты и более низкая доля моно-

ненасыщенной олеиновой ($C_{18:1}$) ЖК. Высокое содержание пальмитиновой ($C_{16:0}$) ЖК при относительно невысоком содержании олеиновой ($C_{18:1}$) кислоты также отмечается в эритроцитах этих млекопитающих (таблица). Показано [9; 10], что основная часть мононенасыщенной олеиновой ($C_{18:1}$) кислоты в организме образуется из насыщенной пальмитиновой ($C_{16:0}$) кислоты. У человека и грызунов это происходит преимущественно путем удлинения углеводородной цепи пальмитиновой ($C_{16:0}$) ЖК на два атома углерода с помощью фермента Elov16 из группы элонгаз (до стеариновой ($C_{18:0}$) кислоты) и дальнейшего образованию в этой цепи двойной связи благодаря действию $\Delta 9$ -десатуразы. При этом в плазме крови и эритроцитах крыс также отмечается меньшая доля стеариновой ($C_{18:0}$) кислоты (таблица). Таким образом, полученные результаты указывают на более низкую активность данных ферментов в организме крыс в сравнении с человеком.

Состав жирных кислот плазмы крови (1), эритроцитов (2) и артерий эластического типа (3) людей и крыс

Жирные кислоты, %	Люди			Крысы		
	(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)
миристиновая ($C_{14:0}$)	0,64±0,12	0,30±0,06	2,54 [2,39; 3,28]	0,94±0,09**	0,36±0,02*	2,89 [2,58; 3,18]
пальмитиновая ($C_{16:0}$)	26,82±1,55	25,80±0,77	25,47 [23,45; 27,38]	26,92±0,96	34,06±0,72***	32,20 [31,33; 33,67]**
маргариновая ($C_{17:0}$)	0,32±0,04	0,42±0,06	0,18 [0,16; 0,25]	0,37±0,03*	0,74±0,05***	0,14 [0,13; 0,17]
стеариновая ($C_{18:0}$)	11,98±0,67	23,59±0,84	6,10 [5,36; 7,16]	9,46±0,52***	19,64±0,40***	5,94 [4,81; 7,69]
пальмитолеиновая ($C_{16:1}$)	1,55±0,29	0,16±0,12	6,78 [5,10; 7,60]	3,68±0,43***	0,65±0,08***	7,02 [6,41; 7,47]
олеиновая ($C_{18:1}$)	16,55±1,17	14,35±0,91	43,29 [41,89; 43,73]	16,51±0,78	6,65±0,20***	32,79 [31,61; 34,84]**
линолевая ($C_{18:2}$)	30,37±2,22	13,95±1,09	9,08 [8,93; 10,13]	24,18±0,56***	8,76±0,31***	10,80 [7,80; 14,41]
эйкозатриеновая ($C_{20:3}$)	1,14±0,17	1,31±0,16	0,06 [0,00; 0,13]	0,47±0,08***	0,46±0,06***	0,07 [0,02; 0,14]
арахидоновая ($C_{20:4}$)	6,17±0,64	14,52±0,56	0,32 [0,20; 0,51]	11,53±1,08***	22,24±0,61***	0,48 [0,13; 0,92]
докозагексаеновая ($C_{22:6}$)	2,23±0,43	4,56±0,42	0,18 [0,09; 0,31]	1,37±0,11***	2,30±0,13***	0,05 [0,03; 0,05]*

Примечание 1: различия достоверны * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$.

Примечание 2: некоторые ЖК, присутствующие в минорных количествах, не указаны.

Имеющиеся в научной литературе данные [9; 10] свидетельствуют о том, что снижение активности элонгазы Elov16 и $\Delta 9$ -десатуразы у мышей приводит к улучшению чувствительности их клеток к инсулину, сокращению уровня триглицеридов, а также повышает устойчивость этих животных к развитию ожирения. Также существуют сведения [11; 12], согласно которым низкая активность $\Delta 9$ -десатуразы стимулирует окисление ЖК в митохондриях и ингибирует липидный синтез в печени, бурой жировой ткани и скелетной мускулатуре. Следовательно, способствуя использованию ЖК в процессах окислительного метаболизма и торможению липидного синтеза, невысокая активность $\Delta 9$ -десатураз в артериях может тормозить развитие атеросклероза. Таким образом, низкая активность указанных ферментов, может быть одной из причин устойчивости крыс к атеросклерозу.

В сравнении с человеком крысы имеют почти вдвое более высокую долю полиненасыщенной арахидоновой ($C_{20:4}$) кислоты и более низкую долю полиненасыщенной линолевой ЖК в эритроцитах и в плазме крови (таблица). Это указывает на то, что активность элонгазы Elovl5 в организме крысы существенно выше ее активности в организме человека. Установлено [13], что действие данного фермента у человека и грызунов является важным шагом при превращении линолевой ($C_{18:2}$) кислоты в арахидоновую ($C_{20:4}$) кислоту, для которого требуется удлинение углеводородной цепи на 2 атома углерода. Следовательно, высокая активность данной элонгазы объясняет наблюдаемую у крыс высокую долю арахидоновой ($C_{20:4}$) кислоты при относительно низком значении доли линолевой ($C_{18:2}$) кислоты (таблица). При этом существуют данные [10; 13], что повышенная активность Elovl5 положительно сказывается на липидном обмене в печени, снижая содержание в ней триглицеридов, а также вызывает сокращение содержания триглицеридов и холестерина в плазме крови. Селективный нокаунт этого фермента наоборот вызывает экспрессию липогенных ферментов, приводя к стеатозу печени и гипертриглицеридемии. Таким образом, высокая активность Elovl5 у крыс может способствовать их устойчивости к развитию атеросклероза путем снижения экспрессии липогенных ферментов.

Повышенная доля арахидоновой ($C_{20:4}$) кислоты при пониженной доле линолевой ($C_{18:2}$) кислоты у крыс указывает и на более высокую, чем у человека, активность $\Delta 6$ - и $\Delta 5$ -десатураз. Участие этих ферментов [14; 15] требуется для химического превращения линолевой ($C_{18:2}$) кислоты в арахидоновую ($C_{20:4}$) ЖК и реализуется путем вставки двойных связей в углеводородную цепь кислоты. При этом благодаря активному использованию линолевой ($C_{18:2}$) кислоты в реакциях с участием $\Delta 6$ - и $\Delta 5$ -десатураз синтез из олеиновой ($C_{18:1}$) кислоты эндогенной ω -9 полиненасыщенной эйкозатриеновой ($C_{20:3}$) ЖК (также осуществляющийся благодаря этим десатуразам и возрастающий в условиях дефицита полиненасыщенных кислот [14]), в организме крыс оказывается подавленным. Об этом свидетельствует крайне низкая доля эйкозатриеновой ($C_{20:3}$) кислоты, как в плазме крови, так и в эритроцитах этих животных (таблица). Необходимо также отметить, что поступление в организм значительного количества полиненасыщенных ЖК подавляет активность $\Delta 9$ -десатуразы [15; 16; 17]. В связи с этим можно заключить, что существенно более высокая в сравнении с человеком доля полиненасыщенной арахидоновой ($C_{20:4}$) кислоты в крови крыс ограничивает активность этого фермента и способствует отмечаемому в артериальных сосудах и эритроцитах этих животных более низкому содержанию олеиновой ($C_{18:1}$) кислоты.

Следует обратить внимание, что значительное количество полиненасыщенной арахидоновой ($C_{20:4}$) ЖК в эритроцитах крыс может быть необходимо для того, чтобы нивелировать влияние на липидный бислой высокого содержания насыщенной пальмитиновой ($C_{16:0}$) кислоты, которая, как известно [18] содействует увеличению вязкости мембран. Другими словами, невысокая активность $\Delta 9$ -десатуразы, участвующей в превращении насыщенного пальмитата в мононенасыщенный олеат, способствует росту вязкости мембран путем снижения содержания в них ненасыщенных кислот. При этом повышение вязкости мембран у крыс, по-видимому, предотвращается повышенной активностью $\Delta 5$ - и $\Delta 6$ -десатураз и элонгаз, участвующих в образовании полиненасыщенной арахидоновой ($C_{20:4}$) ЖК. Таким образом, сбалансированность в активности отдельных видов элонгаз и десатураз в значительной мере способствует тому, чтобы клеточные мембраны не были слишком вязкими или слишком текучими и имели необходимую функциональную активность. Вероятно, именно с разницей в способах поддержания оптимального физико-химического состояния клеточных мембран связаны различия в активности отдельных элонгаз и десатураз у людей и крыс. Побочным результатом

отличий в активности отдельных десатураз и элонгаз в организме крысы и человека может быть наблюдаемые у крыс более низкое содержание холестерина в плазме крови [2] и более высокая устойчивость к атеросклерозу [2; 3; 4].

Необходимо также указать на сравнительно невысокие значения доли ω -3 полиненасыщенной докозагексаеновой ($C_{22:6}$) кислоты в эритроцитах, плазме крови и сосудах лабораторных крыс (таблица). Учитывая это, а также тот факт, что ω -6 полиненасыщенная арахидоновая ($C_{20:4}$) кислота занимает значительный процент в составе ЖК эритроцитов и плазмы крови этих животных, можно заключить, что мембранные ω -3 полиненасыщенные ЖК не являются тем фактором, который препятствует развитию атеросклероза у крыс.

Заключение

Полученные данные свидетельствуют о низкой активности элонгазы Elovl6 и Δ 9-десатуразы и высокой активности элонгазы Elovl5 и Δ 5- и Δ 6-десатураз в организме крыс в сравнении с человеческим организмом. Можно предположить, что установленные отличия являются одной из причин более высокой устойчивости крыс к атеросклерозу, так как по современным представлениям такой характер изменений активности указанных ферментов приводит к повышению чувствительности клеток к инсулину, сокращению активности липогенных ферментов и снижению содержания липидов в плазме крови.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. **Крепкова, Л. В.** Использование модели гиперлипидемии и атеросклероза у крыс в токсикологическом эксперименте / Л. В. Крепкова // Биомедицина. – 2011. – № 3. – С. 103–106.
2. **Климов, А. Н.** Липиды, липопротеиды и атеросклероз / А. Н. Климов, Н. Г. Никольчева. – СПб. : Питер Пресс, 1995. – 304 с.
3. **Титов, В. Н.** Жирные кислоты. Физическая химия, биология и медицина / В. Н. Титов, Д. М. Лисицын. – Москва ; Тверь : ООО "Издательство «Триада», 2006. – 672 с.
4. **Ritskes-Hoitinga, J.** Atherosclerosis in the rat / J. Ritskes-Hoitinga, A. C. Beynen // Artery. – 1988. – Vol. 16, № 1. – P. 25–50.
5. **Кейтс, М.** Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов : пер. с англ. / М. Кейтс. – М. : Мир, 1975. – 322 с.
6. **Осипенко, А. Н.** Плазматогенные фосфолипиды при гипоксии миокарда и экспериментальной гипоксии / А. Н. Осипенко // Атеросклероз и Дислипидемии. – 2015. – № 1(18). – С. 30–40.
7. **Гланц, С.** Медико-биологическая статистика : пер. с англ. / С. Гланц. – Москва : Практика, 1998. – 459 с.
8. **Березов, Т. Т.** Биологическая химия : учебник. – 3-е изд., перераб. и доп. / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. – Москва : Медицина, 1998. – 704 с.
9. Adipose tissue fatty acid chain length and mono-unsaturation increases with obesity and insulin resistance / C. Y. Tan [et al.] // Sci. Rep. – 2015. – Vol. 5. – 18366.
10. Role of fatty acid elongases in determination of de novo synthesized monounsaturated fatty acid species / C. D. Green [et al.] // J. Lipid Res. – 2010. – Vol. 51, № 7. – P. 1871–1877.
11. Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity / J. M. Ntambi [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2002. – Vol. 99, № 17. – P. 11482–11486.
12. Stearoyl-CoA desaturase 1 deficiency increases fatty acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase in liver / P. Dobrzyn [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2004. – Vol. 101, № 17. – P. 6409–6414.
13. Elevated hepatic fatty acid elongase-5 activity affects multiple pathways controlling hepatic lipid and carbohydrate composition / Y. Wang [et al.] // J. Lipid Res. – 2008. – Vol. 49, № 7. – P. 1538–1552.
14. **Назаров, П. Е.** Полиненасыщенные жирные кислоты как универсальные эндогенные биорегуляторы / П. Е. Назаров, Г. И. Мягкова, Н. В. Гроза // Вестник МИТХТ. – 2009. – Т. 4, № 5. – С. 3–19.

15. **Nakamura, M. T.** Structure, function, and dietary regulation of delta6, delta5, and delta9 desaturases / M. T. Nakamura, T. Y. Nara // *Annu. Rev. Nutr.* – 2004. – Vol. 24. – P. 345–376.
16. **Kersten, S.** Effects of fatty acids on gene expression: role of peroxisome proliferator-activated receptor α , liver X receptor α and sterol regulatory element-binding protein-1c / S. Kersten // *Proceedings of the Nutrition Society.* – 2002. – Vol. 61, № 3. – P. 371–374.
17. **Ntambi, J. M.** Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol / J. M. Ntambi // *J. Lipid Res.* – 1999. – Vol. 40, № 9. – P. 1549–1558.
18. **Болдырев, А. А.** Биомембранология : учебное пособие / А. А. Болдырев, Е. И. Кяйвярйянен, В. А. Илюха. – Петрозаводск : Изд-во Кар НЦ РАН, 2006. – 226 с.

Поступила в редакцию 16.05.2019 г.

Контакты: alosipenko@yandex.ru (Осипенко Александр Николаевич)

Osipenko A. ANTIATHEROGENIC NATURE OF FATTY ACID SYNTHESIS IN RATS IS ONE OF THE POSSIBLE REASONS FOR THEIR RESISTANCE TO ATHEROSCLEROSIS.

The article presents experimental data indicating that one of the reasons of rats' high resistance to atherosclerosis, in comparison with humans, may be the difference in the activity of a number of enzymes involved in elongation and desaturation of fatty acids.

Keywords: atherosclerosis, rats, fatty acids, fatty acid desaturase, fatty acid elongase.