

Влияние ω -3-полиненасыщенных жирных кислот на свободнорадикальные процессы и структурное состояние мембран эритроцитов у пациентов с метаболическим синдромом

Н.Н. Крайнова¹, Н.И. Волкова², Т.П. Попова¹, М.С. Комурджанц², В.В. Внуков¹

¹Южный Федеральный университет, Ростов-на-Дону
ректор – профессор В.Г. Захаревич

²Ростовский государственный медицинский университет,
ректор – профессор А.А. Сависько

Представлены данные об изменении чувствительности тканей к инсулину, характере изменений в системе антиоксиданты-прооксиданты и структурном состоянии мембран эритроцитов у 30 пациентов в возрасте от 20 до 58 лет с метаболическим синдромом на фоне приема препарата, содержащего ω -3-полиненасыщенные жирные кислоты. Выявлено повышение чувствительности тканей к инсулину, снижение активности свободнорадикального окисления, нормализация активности антиоксидантных ферментов и стабилизация мембран эритроцитов через 3 месяца от начала приема омакора. *Ключевые слова:* метаболический синдром, омега-3-полиненасыщенные жирные кислоты, чувствительность к инсулину, эритроциты.

This article presents data on tissue sensitivity to insulin, type of change in antioxidant-prooxidant system and membrane structure of erythrocytes in 30 patients from 20 to 58 years of age with metabolic syndrome who received a preparation of ω -3 polyunsaturated fatty acids. After 3 months of treatment with omacor we revealed the increase in the tissue insulin sensitivity, lowering of the free radical activity, normalization of antioxidant enzyme activity and erythrocyte's membranes stabilization. *Key words:* metabolic syndrome, omega-3, polyunsaturated fatty acids, insulin sensitivity, erythrocyte.

С начала XX века в развитых странах мира широкое распространение получили заболевания, связанные с нарушением метаболизма, к числу которых относится метаболический синдром (МС). Необходимо подчеркнуть, что, несмотря на выраженный интерес к этой проблеме и довольно большое количество публикаций, посвященных теоретическим и практическим аспектам МС, создание клинических рекомендаций различными профессиональными обществами, до сих пор не существует единых диагностических и терапевтических подходов. Отчасти это вызвано недостаточным количеством знаний об этиологии и патогенезе МС, отчасти — многообразием клинических и патофизиологических проявлений этого заболевания.

Общеизвестно, что при МС наблюдаются нарушения углеводного, липидного обмена, образуются эндогенные патогены, возникает хроническое воспаление и эндотелиальная дисфункция [1]. В настоящее время активно ведутся поиски фармакологического вещества, которое бы влияло одновременно на несколько звеньев патогенеза МС. К средствам, нормализующим липидный обмен, с недавнего времени стали относить ω -3-полиненасыщенные жирные кислоты (ω -3-ПНЖК). Помимо этого, ω -3-ПНЖК обладают рядом плеiotропных эффектов. Так, они позитивно действуют на эндотелий за счет снижения экспрессии адгезивных молекул на его поверхности и в циркулирующей плазме, уменьшают продукцию тромбоцитарного фактора роста, потенцируют NO-зависимую релаксацию эндотелия, усиливают антитромбоген-

ный потенциал цельной крови и сосудистой стенки и др. Известно также, что ω -3-ПНЖК являются предшественниками преимущественно эйкозаноидов и других биологически активных веществ с противовоспалительными свойствами [2].

Ранее нами было показано, что у пациентов с МС без нарушения углеводного обмена наблюдаются изменения в системе «антиоксиданты — прооксиданты», которые выражаются в повышенной генерации активных кислородных метаболитов, усилении процессов ПОЛ на фоне компенсаторного увеличения активности антиоксидантных ферментов, а также изменения структуры эритроцитарной мембраны [3].

Цель настоящей работы — исследование интенсивности свободнорадикального окисления (СРО) и активности антиоксидантной системы крови, а также структурного состояния мембран эритроцитов у пациентов с МС при лечении препаратом, содержащим ω -3-ПНЖК (торговое название «Омакор»).

Материалы и методы

В исследование включено 30 пациентов обоего пола в возрасте от 20 до 58 лет, согласно критериям МС (IDF 2005 г.) и Национальным рекомендациям «Диагностика и лечение МС» (2007 г.): все пациенты имели ожирение (ИМТ $\geq 29,9$) по абдоминальному типу (ОТ мужчин ≥ 94 см, ОТ женщин ≥ 80 см) и два дополнительных критерия. Оценку толерантности к углеводам осуществляли с помощью 2-часового перорального глюкозотолерантного теста

Таблица 1

Параметры спонтанной и H ₂ O ₂ -люминол-индуцированной ХЛ и содержание продуктов ПОЛ в крови пациентов с метаболическим синдромом на фоне лечения омакором M±σ			
Показатель	Группа доноров n=20	Пациенты с МС	
		До лечения n=30	Через 3 мес. n=30
Вспышка (h) H ₂ O ₂ -люминол-индуцированной ХЛ, отн. ед.	37,9±2,9	68,5±2,2 p<0,001	42,8±3,1 p>0,05 p ₁ <0,001
Максимальная светимость (H) H ₂ O ₂ -люминол-индуцированной ХЛ, отн. ед.	44,6±1,5	61,7±1,9 p<0,001	53,1±2,01 p<0,01 p ₁ <0,001
Sm H ₂ O ₂ -люминол-индуцированной ХЛ за 5 мин., отн. ед.	168,3±10,9	252,9±13,6 p<0,001	193,9±3,3 p>0,05 p ₁ <0,001
tg угла наклона H ₂ O ₂ -люминол-индуцированной ХЛ, отн. ед.	25,8±2,3	34,2±0,7 p<0,02	28,3±0,7 p>0,05 p ₁ <0,001
ДК в плазме, нмоль/мг ОЛ	9,50±0,31	12,26±1,17 p<0,01	9,54±0,52 p>0,05 p ₁ <0,05
ДК в гемолизате, нмоль/мг ОЛ	9,9±0,5	14,9±0,2 p<0,001	11,0±0,3 p>0,05 p ₁ <0,001
МДА в плазме, нмоль/мл	23,88±0,67	29,80±1,09 p<0,001	25,08±1,0 p>0,05 p ₁ <0,01
МДА в гемолизате, нмоль/мг Нб	2,9±0,1	4,6±0,3 p<0,001	3,4±0,2 p<0,05 p ₁ <0,01
ШО в плазме, ед. фл/мг ОЛ	0,55±0,02	0,54±0,02 p>0,05	0,49±0,02 p>0,05 p ₁ >0,05
ШО в гемолизате, ед. фл/мг ОЛ	0,56±0,02	0,72±0,26 p<0,001	0,66±0,03 p<0,02 p ₁ >0,05

Примечание. Здесь и в табл. 2-3: p – значимость изменений показателя по сравнению с группой доноров; p₁ – значимость изменений показателя по сравнению с началом лечения.

(ПГТТ) по протоколу, предложенному ВОЗ (1985). Содержание глюкозы в капиллярной крови определяли глюкозооксидазным методом с помощью стандартного клинического набора («Ольвекс-диагностикум», Санкт-Петербург). Для оценки инсулинорезистентности (ИР) при проведении ПГТТ одномоментно определяли концентрацию глюкозы и иммунореактивного инсулина (ИРИ) в сыворотке крови с последующим расчетом индекса Саго (отношение концентрации глюкозы и концентрации ИРИ). При значении индекса менее 0,33 состояние расценивали как ИР [4]. Базальный и стимулированный глюкозой уровень ИРИ определяли иммуноферментным методом с помощью диагностического набора (DRG, Германия).

Пациенты с МС получали перорально в течение 3-х месяцев препарат, содержащий ω-3-ПНЖК (Омакор), по 1 капсуле ежедневно. Все клинико-биохимические исследования проводили до начала лечения и через 3 месяца терапии. В качестве контроля обследовано 20 доноров соответствующего пола и возраста, худощавого телосложения

(ОТ мужчин <94 см, ОТ женщин <80 см), без вредных привычек.

Для изучения процессов СРО и антиоксидантной системы исследовали H₂O₂-люминол-индуцированную хемилюминесценцию (ХЛ) [5]. Интенсивность процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) определяли по содержанию первичных продуктов — диеновых конъюгатов (ДК) [6], вторичных — малонового диальдегида (МДА) по методике из [7] и конечных — шиффовых оснований (ШО) [8]. Количество общих липидов в хлороформном экстракте [9] плазмы крови и гемолизате определяли по цветной реакции с фосфованилиновым реактивом по методу Колба и Камышиникова (1982) с помощью стандартного диагностического набора (ЭКОлаб, Россия).

Состояние ферментной антиоксидантной системы оценивали по активности супероксиддисмутазы (СОД) [10], каталазы [11] и церулоплазмينا (ЦП) [12]. Структурное состояние мембран эритроцитов определяли с помощью флуоресцентного зонда пирена в суспензии эритроцитов [13]. Стабильность эритроцитарных мембран оценивали по содержанию внеэритроцитарного гемоглобина (ВЭГ) в плазме гемоглобинцианидным методом Каракашова и Вичева (1973) и суммарной пероксидазной активности (СПА) (Покровский, 1969, в модификации Лукаша и др., 1996) [14]. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Biostat. Значимость различий между изучаемыми величинами определяли по t-критерию Стьюдента. Критический уровень значимости (p) при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05, данные в тексте представлены в виде M±σ (среднее ± стандартное отклонение).

Результаты

У пациентов с МС на фоне лечения омакором амплитуда быстрой вспышки (h) H₂O₂-люминол-индуцированной ХЛ снижалась на 38% и значимо не отличалась от этой величины, измеренной у доноров. Максимальная светимость (H) и светосумма (Sm) медленной вспышки снижались на 14 и 23%, скорость окисления липидов — на 17%. Амплитуда быстрой вспышки, светосумма медленной вспышки и скорость окисления липидов значимо не отличались от уровня, зарегистрированного у доноров (табл. 1).

Таким образом, в плазме крови больных МС интенсивность ХЛ на фоне лечения омакором по четырем показателям значимо снижалась, что свидетельствует об уменьшении интенсивности СРО в организме.

В результате проведенных исследований нами установлено, что по сравнению с периодом, предшествующим лечению, в плазме крови больных МС, содержание первичных (ДК) и вторичных (МДА) продуктов перекисного окисления снизилось на 22 и 16%. Эти параметры значимо не отличались от измеренных у доноров. Статистически значимого изменения концентрации конечных (ШО) продуктов ПОЛ не обнаружено при сравнении с группой доноров и с исходным фоном (табл. 1).

В эритроцитах прослеживалась аналогичная динамика. Через 3 месяца от начала приема препарата содержание ДК снижалось относительно исходного фона на 26%, МДА — на 26%, ШО — на 8%. При сравнении с группой доноров обнаружено, что концентрация первичных и конечных продуктов ПОЛ значимо не отличалась, тогда как уровень

Таблица 2

Активность антиоксидантных ферментов в крови пациентов с МС на фоне лечения омакором М±σ			
Показатель	Группа доноров n=20	Пациенты с МС	
		До лечения n=30	Через 3 мес. n=30
ЦП в плазме, мкмоль/л	1,34±0,03	2,10±0,05 p<0,001	1,81±0,11 p<0,001 p ₁ <0,05
СОД в плазме (СУА), у.е./мин в мл плазмы	0,61±0,06	1,15±0,04 p<0,001	0,79±0,05 p>0,05 p ₁ <0,001
СОД в гемолизате, у.е./мин в мг Нб	0,84±0,12	1,69±0,12 p<0,001	0,90±0,08 p>0,05 p ₁ <0,001
Каталаза в плазме, нмоль H ₂ O ₂ /мл	15,8±0,8	17,2±1,7 p>0,05	13,08±0,8 p<0,05 p ₁ <0,05
Каталаза в гемолизате, нмоль H ₂ O ₂ /мл	23,4±1,5	28,9±1,3 p<0,05	24,9±0,9 p>0,05 p ₁ <0,05

МДА после лечения омакором превышал значения, обнаруженные у доноров на 17%.

Таким образом, на фоне терапии пациентов с МС препаратом, содержащим ω-3-ПНЖК (омакор), наблюдается снижение интенсивности СРО полиненасыщенных жирных кислот, выражающееся в снижении концентрации продуктов ПОЛ в большей степени в эритроцитах и в меньшей степени в плазме крови (табл. 1).

Сохранение равновесия между скоростью ПОЛ и активностью антиоксидантной системы — один из основных показателей гомеостаза, при этом первой линией антирадикальной защиты являются антиоксидантные ферменты. В плазме крови пациентов с МС после лечения омакором, по сравнению с исходным фоном, наблюдалось снижение активности антиоксидантных ферментов: церулоплазмина на 14, СОД — на 31, каталазы — на 24%. При сравнении этих показателей с группой доноров установлено, что активность СОД значимо не отличалась, ЦП была выше, чем у доноров, на 26%, а каталазы ниже, чем у доноров, на 17%. В гемолизате эритроцитов активность СОД после лечения снижалась по отношению к исходному фону на 47%, каталазы — на 14%. Оба эти показателя статистически не отличались от таковых в группе доноров (табл. 2).

Таким образом, мы полагаем, что препарат, содержащий ω-3-ПНЖК (омакор), способствует нормализации свободнорадикального окисления у больных с МС, что проявляется в уменьшении количества продуктов перекисидации и параллельном снижении активности антиоксидантных ферментов через 3 месяца от начала терапии.

При изучении одной из основных функций мембраны, потенциально влияющей на инсулиновую резистентность, было выявлено, что на фоне лечения омакором значимых изменений микровязкости липидного бислоя эритроцитов и текучести зон белок-липидных контактов не отмечалось. Гидрофобность внутренних областей мембраны возросла на 28% и значимо не отличалась от контроля. Степень погружения белков в липидный бислой после лечения сни-

Таблица 3

Структурное состояние мембран эритроцитов, уровни СПА и ВЭГ у пациентов с МС на фоне лечения омакором М±σ			
Показатель	Группа доноров n=20	Пациенты с МС	
		До лечения n=30	Через 3 мес. n=30
F ₃ /F _m (334)	0,68±0,02	0,60±0,03 p<0,05	0,63±0,03 p<0,05 p ₁ >0,05
F ₃ /F _m (282)	1,5±0,112	1,53±0,06 p>0,05	1,51±0,05 p>0,05 p ₁ >0,05
F ₃₇₂ /F ₃₉₃ (334)	1,90±0,06	1,48±0,03 p<0,001	1,89±0,04 p>0,05 p ₁ <0,001
F ₀ -F ₁ /F ₀	0,21±0,01	0,31±0,01 p<0,001	0,26±0,01 p<0,01 p ₁ <0,001
F ₃₇₂ /F ₃₉₃ (282)	2,14±0,09	1,64±0,02 p<0,001	1,91±0,03 p>0,05 p ₁ <0,001
СПА, ед. акт/мл	2,5±0,1	4,8±0,3 p<0,001	3,4±0,2 p<0,002 p ₁ <0,01
ВЭГ, ммоль/л	1,4±0,1	2,8±0,25 p<0,001	1,9±0,1 p<0,001 p ₁ <0,01

жалась на 16% относительно исходной, оставаясь выше, чем в группе доноров, на 24%. Через 3 месяца терапии омакором коэффициент полярности зоны белок-липидных контактов повышался на 17% и значимо не отличался от этого показателя в группе доноров. Таким образом, терапия омакором в течение трех месяцев приводила к нормализации изучаемых физико-химических свойств мембран эритроцитов.

Изменение физико-химических характеристик мембран неизбежно отражается на их стабильности. Обнаруженное нами снижение концентрации ВЭГ на 32 и СПА на 29% свидетельствует о стабилизации мембран эритроцитов после 3-месячного лечения омакором. Следует отметить, что при сравнении с группой доноров, после лечения у пациентов с МС концентрация ВЭГ была на 35% ниже, в то время как СПА превышала контроль на 36%.

Согласно современным представлениям, при МС происходит развитие системного противовоспалительного ответа [15]. Одной из целей такой реакции организма является создание неблагоприятной среды для патогенов путем освобождения оксидантов (перекиси водорода, гипохлорида и др.). В то же время активируется антиоксидантная система для защиты здоровых тканей от оксидативного поражения. По-видимому, этим и объясняется развитие оксидативного стресса у пациентов с МС, установленное в наших исследованиях. Необходимо учесть, что в случае продолжительного воспалительного ответа организму может быть причинен значительный вред, так как эта реакция сопровождается экспрессией фактора некроза опухолей-α (TNF-α), интерлейкина-1 (IL-1), интерлейкина-6 (IL-6) и других провоспалительных цитокинов. Многие эффекты воспалительного ответа являются факто-

рами риска повышенной летальности при большинстве хронических болезней.

ω -3-жирные кислоты способны снижать интенсивность воспалительной реакции благодаря своему влиянию на продукцию цитокинов и эйкозаноидов, а также изменять структуру медиаторов липидной природы, выделяемых клеточной мембраной при воспалении. Поскольку ω -3-жирные кислоты включаются в фосфолипиды легче, чем ω -6-жирные кислоты, а последние легче, чем ω -9-жирные кислоты, результатом этого феномена могут быть как биофизические, так и биохимические изменения структуры биологических мембран. В наших исследованиях нормализация физико-химических характеристик эритроцитарных мембран, а также их стабилизация на фоне приема омакора, по-видимому, объясняется именно этим.

Провоспалительные цитокины способны усиливать экспрессию молекул адгезии на эндотелиальных клетках. TNF- α и IL-1, образованные в воспаленной ткани, облегчают миграцию и направляют лейкоциты из внутрисосудистого пространства в очаг воспаления. Уменьшая TNF-зависимую активацию молекул адгезии, ω -3-ПНЖК снижают экстравазацию лейкоцитов, что, по-видимому, является дополнительным фактором, приводящим к ослаб-

лению системного воспалительного ответа и, как следствие, снижению активности свободнорадикального окисления.

Снижение активности свободнорадикальных процессов параллельно с активностью антиоксидантных ферментов, а также позитивные изменения физико-химических характеристик эритроцитарных мембран, наблюдающиеся у пациентов с МС при лечении омакором, положительно коррелировали со степенью чувствительности тканей к инсулину. На фоне приема омакора происходило уменьшение инсулинорезистентности, что проявлялось в снижении ИРИ натошак на 40% и повышении индекса Саго натошак на 23%. Через 3 месяца от начала терапии омакором указанные показатели значимо не отличались от таковых, определенных в группе доноров.

Таким образом, прием препарата, содержащего ω -3-ПНЖК, в течение 3-х месяцев у пациентов с МС способствовал повышению чувствительности тканей к инсулину, снижению активности СРО, нормализации активности антиоксидантных ферментов, структурно-функциональных свойств эритроцитов и стабилизации их мембран. На наш взгляд, полученные в исследовании результаты открывают новые перспективы в лечении пациентов с МС.

Литература

1. Метаболический синдром / Под ред. чл.-корр. РАН Г.Е. Ройтбейра. М., 2007.
2. Kris-Etherton R. et al. Omega-3 Fatty Acids and Cardiovascular Disease. New Recommendations From the American Heart Association // *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003. V. 23. P. 150–152.
3. Крайнова Н.Н., Попова Т.П., Сафроненко В.А., Волкова Н.И., Внуков В.В. Свободнорадикальные процессы и их регуляция, структурно-функциональное состояние мембран эритроцитов при метаболическом синдроме // *Известия ВУЗ Северо-Кавказский регион. Естественные науки.* 2008. № 6. С. 74–77.
4. Caro J.F. Insulin resistance in obese and nonobese men // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1991. P. 7391–7395.
5. Владимиров Ю.А., Азизова О.А., Деев А.И. Свободные радикалы в живых системах. М., 1991.
6. Стальная И.Д. Современные методы в биохимии. М., 1977. С. 63–64.
7. Стальная И.Д., Горишвили Т.Г. Современные методы в биохимии. М., 1977.
8. Bidlack W.R., Tappel A.L. Fluorescent products of phospholipids during lipid peroxidation // *Lipids.* 1973. Vol. 68. № 4. P. 203–209.
9. Bligh E.J., Dyer W.J. Rapid methods of total lipid extraction and purification // *J. Biochem. Physiol.* 1959. Vol. 37. № 8. P. 911–917.
10. Сирота Т.В. Новый подход в исследовании процесса аутоокисления адреналина и использование его для измерения активности супероксиддисмутазы // *Вопросы мед. химии.* 1999. № 3. С. 14–15.
11. Королюк М.А. и др. Метод определения активности каталазы // *Лабораторное дело.* 1988. № 1. С. 16–19.
12. Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии. Минск, 1982.
13. Владимиров Ю.А., Добрецов Г.В. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М., 1980.
14. Покровский А.А. Биохимические методы исследования в клинике. М., 1969.
15. Титов В.Н. Теория биологических функций и совершенствование диагностического процесса в клинической биохимии // *Клин. лаб. диагностика.* 2009. № 4. С. 3–14.

Крайнова Н.Н.	кандидат биологических наук, кафедра биохимии и микробиологии, биолого-почвенный факультет, Южный Федеральный университет 344006, Ростов н/Д, Б. Садовая, 105 Тел.: (863) 255-79-13 Моб.: +7 904-441-92-74 E-mail: kraynovann@mail.ru
Волкова Н.И.	доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой внутренних болезней № 3, Ростовский государственный медицинский университет 344022, Ростов н/Д, пер. Нахичеванский, 29 Тел.: (863) 275-30-69 E-mail: n_i_volkova@mail.ru
Попова Т.П.	аспирантка, кафедра биохимии и микробиологии, биолого-почвенный факультет, Южный Федеральный университет 344006, Ростов н/Д, Б. Садовая, 105 Тел.: (863) 264-38-50 E-mail: dean@bio.rsu.ru
Внуков В.В.	доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биохимии и микробиологии, биолого-почвенный факультет, Южный Федеральный университет 344006, Ростов н/Д, Б. Садовая, 105 Тел.: (863) 264-38-50 E-mail: dean@bio.rsu.ru