

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 616.12-008.331.1-07:616.153.45

Титов В.Н.¹, Сажина Н.Н.², Евтеева Н.М.², Ариповский А.В.³, Тхагалижокова Э.М.¹

ТИТРОВАНИЕ ДВОЙНЫХ СВЯЗЕЙ В ЖИРНЫХ КИСЛОТАХ ПЛАЗМЫ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ В ТЕСТЕ ТОЛЕРАНТНОСТИ К ГЛЮКОЗЕ

¹ФГБУ Российский кардиологический научно-производственный комплекс Минздрава России, 121552, г. Москва, ул.3-я Черепковская, д. 15а; ²Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, г. Москва; ³ФГУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, г. Оболensk, Московская обл.

Проведен пероральный глюколотерантный тест у 20 пациентов с артериальной гипертензией. В плазме крови определено содержание индивидуальных жирных кислот (ЖК), двойных связей (ДС), глюкозы, инсулина и метаболитов ЖК. У пациентов с различной резистентностью к инсулину (ИР) содержание неэтерифицированных ЖК (НЭЖК) понизилось примерно в 3 раза. Вне ИР секреция инсулина через 2 ч после нагрузки глюкозой выросла в 3 раза, и содержание индивидуальных ЖК снижается в большей мере; при ИР секреция инсулина увеличивается в 8 раз, а уменьшение количества ЖК менее выражено. Понижение в плазме крови содержания ЖК (олеиновой и линолевой) и ДС отражает эффективность действия инсулина – блокаду гидролиза триглицеридов в подкожных адипоцитах. Концентрация инсулина позитивно коррелирует с исходным содержанием пальмитиновой ЖК в пуле липидов плазмы крови.

Ключевые слова: глюколотерантный тест; инсулинорезистентность; двойные связи; жирные кислоты.

Titov V.N.¹, Sajina N.N.², Evteeva N.M.², Aripovskii A.V.³, Tkhalijokova E.M.¹

THE TITRATION OF DOUBLE BONDS IN FATTY ACIDS OF BLOOD PLASMA IN PATIENTS IN TESTING OF GLUCOSE TOLERANCE

¹The Russian cardiologic R&D production complex of Minzdrav of Russia, 121552 Moscow, Russia; ²The institute of biochemical physics of the Russian academy of sciences, Moscow, Russia; ³The state center of applied microbiology and biotechnology, Obolensk, Russia

The article deals with per oral glucose tolerance test applied to 20 patients with arterial hypertension. The blood plasma was analyzed to detect content of individual fatty acids, double bounds, glucose, insulin and metabolites of fatty acids. In patients with different resistance to insulin content of non-etherized fatty acids decreased approximatively up to 3 times. Without insulin resistance secretion of insulin in 2 hours after glucose load increased up to 3 times and content of individual fatty acids decreases in greater extent. Under insulin resistance secretion of insulin increases up to 8 times and decreasing of content of fatty acids is less expressed. The decrease in blood plasma of content of oleic and linoleic fatty acids and double bounds reflects effectiveness of effect of insulin - blockade of hydrolysis of triglycerides in subcutaneous adipocytes. The concentration of insulin positively correlates with initial content of palmitic fatty acid in the pool of lipids of blood plasma.

Key words: glucose tolerance test; insulin resistance; double bounds; fatty acids

Тест толерантности к глюкозе (ГТТ) – наиболее частый функциональный тест клинической биохимии. Это прием 75 г глюкозы per os и определение ее содержания в капиллярной крови натощак и через 2 ч [1]. Гипергликемия активирует поглощение клетками глюкозы по градиенту концентрации межклеточная среда → цитозоль, так как содержание глюкозы в цитозоле всегда несколько ниже, чем в межклеточной среде. Гипергликемию воспринимают сенсоры β-клеток поджелудочной железы и активируют секрецию в кровь проинсулина (инсулин + С-пептид). Образование активной формы инсулина происходит в крови при гидролизе С-пептида. Инсулин блокирует гидролиз триглицеридов (ТГ) в инсулинзависимых подкожных адипоцитах и уменьшает выход в кровоток жирных кислот (ЖК) в форме полярных неэтерифицированных ЖК (НЭЖК). Поглощенные клетками НЭЖК блокируют окисление в митохондриях ацетил-КоА, образованного из глюкозы. Пока митохондрии имеют возможность поглощать НЭЖК из цитозоля и образовать ацетил-КоА при β-окислении в матриксе,

окислять ацетил-КоА из глюкозы они не станут. Оценить влияние инсулина на метаболизм глюкозы можно более обоснованно, одновременно с метаболизмом насыщенных и ненасыщенных ЖК.

Ранее установлено [2], что содержание в плазме крови ТГ взаимосвязано с концентрацией двойных связей (ДС) в ЖК липидов и липопротеинов (ЛП) (со степенью их ненасыщенности), поскольку наличие ДС в ЖК определяет все кинетические параметры метаболизма. Наличие в плазме крови мононенасыщенных ЖК (МЖК) с одной ДС, 2–3 ДС в ненасыщенных ЖК (ННЖК) и 4–6 ДС в полиеновых ЖК (ПНЖК) является в филогенезе своего рода “метаболическим признаком” [3]. Для того чтобы обеспечить инсулинзависимые клетки (скелетные миоциты, кардиомиоциты, жировые клетки и др.) субстратами для наработки энергии, инсулин стал регулировать окисление ЖК в митохондриях и через них метаболизм глюкозы. Исследованием метаболизма ЖК, глюкозы и других аналитов плазмы крови в ходе ГТТ занимались многие авторы (например, [4]), однако ни в одной из этих работ не определены степень ненасыщенности липидов плазмы крови и ее связь с параметрами метаболизма.

Цель настоящей работы – изучение динамики содержания в плазме крови у пациентов с артериальной гипертензией (АГ) ДС, инсулина, глюкозы, С-пептида и

Для корреспонденции:

Сажина Наталья Николаевна, канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотр.
Адрес: 119334, Москва, ул. Косыгина, 4
E-mail: Natnik48s@yandex.ru

Средняя концентрация аналитов ЖК и ДС в плазме крови у пациентов в динамике ГТТ при отсутствии ИР (1-я группа) и наличии (2-я группа)

| Аналиты, $M \pm \sigma$ | Натошак | Через 2 ч | Через 4 ч | Степень изменения ($M_{2ч}/M_{нат}$) | t-тест |
|---------------------------|------------------|------------------|-------------------|--|-------------------|
| Глюкоза, ммоль/л | $6,15 \pm 0,53$ | $5,82 \pm 1,04$ | $4,25 \pm 0,29$ | 0,95 | 0,506 |
| | $6,16 \pm 0,62$ | $9,93 \pm 1,63$ | $4,29 \pm 0,83$ | 1,61 | 0,0001 |
| Инсулин, МЕ/мл | $18,3 \pm 6,5$ | $54,7 \pm 32,3$ | $11,5 \pm 5,8$ | 2,99 | 0,018 |
| | $13,5 \pm 4,3$ | $106,0 \pm 39,6$ | $16,5 \pm 6,3$ | 7,85 | $2 \cdot 10^{-5}$ |
| С-пептид, нг/мл | $4,5 \pm 0,9$ | $11,1 \pm 2,3$ | $4,1 \pm 1,1$ | 2,48 | 0,0001 |
| | $4,0 \pm 1,1$ | $17,3 \pm 4,7$ | $7,1 \pm 1,9$ | 4,33 | $3 \cdot 10^{-7}$ |
| НЭЖК, ммоль/л | $0,49 \pm 0,17$ | $0,15 \pm 0,04$ | $0,48 \pm 0,28$ | 0,31 | 0,001 |
| | $0,55 \pm 0,14$ | $0,19 \pm 0,15$ | $0,34 \pm 0,19$ | 0,35 | $5 \cdot 10^{-9}$ |
| ЖК, ммоль/л НЖК: С14:0 | $0,17 \pm 0,06$ | $0,15 \pm 0,05$ | $0,14 \pm 0,05$ | 0,88 | 0,096 |
| | $0,15 \pm 0,05$ | $0,13 \pm 0,04$ | $0,13 \pm 0,04$ | 0,87 | 0,022 |
| С15:0 | $0,03 \pm 0,01$ | $0,03 \pm 0,01$ | $0,03 \pm 0,01$ | 1,00 | 0,811 |
| | $0,04 \pm 0,01$ | $0,03 \pm 0,01$ | $0,04 \pm 0,01$ | 0,75 | 0,371 |
| С16:0 | $2,76 \pm 0,53$ | $2,55 \pm 0,51$ | $2,53 \pm 0,75$ | 0,92 | 0,052 |
| | $2,79 \pm 0,53$ | $2,56 \pm 0,51$ | $2,63 \pm 0,57$ | 0,92 | 0,008 |
| С18:0 | $0,67 \pm 0,15$ | $0,62 \pm 0,20$ | $0,63 \pm 0,15$ | 0,93 | 0,016 |
| | $0,66 \pm 0,16$ | $0,63 \pm 0,22$ | $0,63 \pm 0,15$ | 0,95 | 0,011 |
| МЖК: С16:1 | $0,27 \pm 0,06$ | $0,25 \pm 0,09$ | $0,23 \pm 0,09$ | 0,93 | 0,262 |
| | $0,31 \pm 0,11$ | $0,27 \pm 0,09$ | $0,27 \pm 0,09$ | 0,87 | 0,004 |
| С18:1 | $2,12 \pm 0,45$ | $1,88 \pm 0,45$ | $1,91 \pm 0,55$ | 0,88 | 0,006 |
| | $2,24 \pm 0,47$ | $1,96 \pm 0,35$ | $1,96 \pm 0,45$ | 0,88 | 0,003 |
| ННЖК: С18:2 | $3,09 \pm 0,68$ | $2,79 \pm 0,60$ | $2,83 \pm 0,82$ | 0,90 | 0,059 |
| | $3,17 \pm 0,50$ | $2,91 \pm 0,54$ | $2,97 \pm 0,54$ | 0,92 | 0,027 |
| С20:3 | $0,13 \pm 0,03$ | $0,13 \pm 0,04$ | $0,13 \pm 0,04$ | 1,00 | 0,457 |
| | $0,15 \pm 0,05$ | $0,14 \pm 0,05$ | $0,14 \pm 0,05$ | 0,93 | 0,143 |
| ПНЖК: С20:4 | $0,71 \pm 0,26$ | $0,69 \pm 0,25$ | $0,72 \pm 0,30$ | 0,97 | 0,458 |
| | $0,69 \pm 0,19$ | $0,68 \pm 0,19$ | $0,70 \pm 0,19$ | 0,98 | 0,786 |
| С20:5 | $0,06 \pm 0,02$ | $0,06 \pm 0,02$ | $0,06 \pm 0,02$ | 1,00 | 0,674 |
| | $0,07 \pm 0,04$ | $0,065 \pm 0,03$ | $0,063 \pm 0,02$ | 1,00 | 0,512 |
| С22:5 | $0,043 \pm 0,01$ | $0,044 \pm 0,01$ | $0,042 \pm 0,01$ | 1,02 | 0,720 |
| | $0,042 \pm 0,01$ | $0,041 \pm 0,01$ | $0,042 \pm 0,01$ | 0,98 | 0,516 |
| С22:5 | $0,043 \pm 0,01$ | $0,044 \pm 0,01$ | $0,042 \pm 0,01$ | 1,02 | 0,720 |
| | $0,042 \pm 0,01$ | $0,041 \pm 0,01$ | $0,042 \pm 0,01$ | 0,98 | 0,516 |
| С22:6 | $0,198 \pm 0,06$ | $0,195 \pm 0,08$ | $0,186 \pm 0,092$ | 0,98 | 0,877 |
| | $0,226 \pm 0,11$ | $0,220 \pm 0,09$ | $0,229 \pm 0,09$ | 0,97 | 0,641 |
| ДС, ммоль/л, по O_3 | $13,55 \pm 2,75$ | $12,54 \pm 2,92$ | $12,79 \pm 3,55$ | 0,925 | 0,067 |
| | $13,96 \pm 2,83$ | $13,02 \pm 2,55$ | $13,27 \pm 2,67$ | 0,933 | 0,068 |

Примечание. В числителе – 1-я группа ($n = 7$), в знаменателе – 2-я ($n = 13$). $M \pm \sigma$, где σ – среднеквадратичное отклонение в группах.

индивидуальных ЖК для выяснения функциональных связей между ними с использованием модели ГТТ.

Материалы и методы. ГТТ провели согласно рекомендациям ВОЗ и Международной федерации сахарного диабета у 20 пациентов с диагнозом АГ в Институте клинической кардиологии. Кровь брали из вены натощак и через 2 и 4 ч с помощью пластиковых шприцов с антикоагулянтом ЭДТА. Плазму крови отделяли от эритроцитов и хранили

при -70°C . Содержание индивидуальных ЖК определили на газовом хроматографе “Вариан 3900” (США), используя стандартные образцы ЖК фирмы Супелко (Швейцария). Концентрацию индивидуальных ЖК выражали в мг/л (в ммоль/л) плазмы крови [5]. Содержание инсулина и С-пептида измеряли на анализаторе “Иммулайт (ФРГ), а глюкозы, ТГ, НЭЖК и других аналитов плазмы крови – на биохимическом анализаторе “Архитект-800” (США).

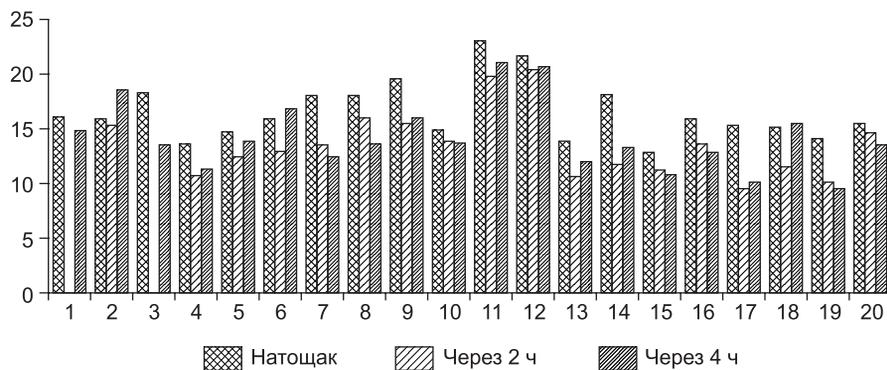


Рис. 1. Динамика содержания ДС (в ммоль/л) в плазме крови у 20 пациентов в ГТТ, определенная методом озонирования.

Суммарное содержание ДС (в ммоль/л) в липидном пуле плазмы крови определяли методом озонирования, который основан на способности озона (O_3) быстро присоединяться к ДС в ЖК с константой скорости реакции порядка 10^5 – 10^6 $M^{-1}\cdot c$ [6]. Липидную фракцию из плазмы крови экстрагировали хлороформом с последующим отделением ее водно-метанольной смесью. Измерения выполняли на анализаторе ДС АДС-4М. В нем УФ-спектрофотометр регистрирует концентрацию O_3 на входе и выходе реактора, а встроенный интегратор рассчитывает суммарный расход O_3 в реакции, пропорциональный количеству ДС в образце. В качестве стандартного образца использовали стильбен с одной ДС. Для контроля работы прибора взяли β -каротин, который показал наличие у него 11 ДС [7]. Содержание ДС рассчитывали по формуле:

$$ДС = S_{обр.} \cdot V_{ст.} \cdot C_{ст.} / S_{ст.} \cdot V_{обр.},$$

где $S_{обр.}$ и $S_{ст.}$ – показания образца и стильбена; $C_{ст.}$ – концентрация стильбена, $V_{обр.}$ и $V_{ст.}$ – объем образца и стильбена. Погрешность измерения суммарного содержания ДС в липидном пуле плазмы крови с учетом повторяемости результатов составила $\pm 15\%$.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью стандартных алгоритмов программ MS Excel. Достоверность различия величин считали по t -критерию Стьюдента (t -тест), используя 95% доверительную вероятность [8].

Результаты и обсуждение. При нормальном или повышенном содержании глюкозы в крови натощак, через 2 ч после ее приема уровень менее чем 7,8 ммоль/л оце-

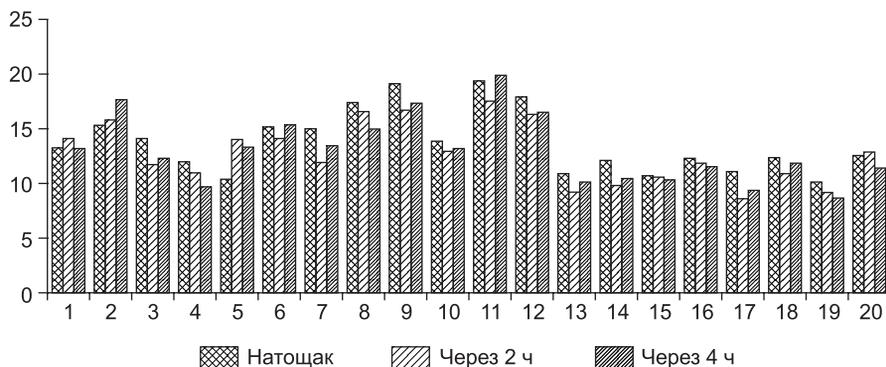


Рис. 2. Концентрация (в ммоль/л) ДС в плазме крови у 20 пациентов в разные сроки ГТТ, рассчитанная по сумме концентраций индивидуальных ЖК с учетом их ДС.

нивают как норму. При содержании глюкозы более чем 7,8 ммоль/л гипергликемию рассматривают как нарушение толерантности к глюкозе, т.е. состояние резистентности к инсулину (ИР). В таблице приведены определенные в динамике ГТТ средние значения концентрации некоторых аналитов, индивидуальных ЖК и ДС для двух групп пациентов: без ИР (1-я группа; $n=7$) и с ИР (2-я группа; $n=13$).

В срок 2 ч ГТТ средняя концентрация глюкозы у пациентов без ИР достоверно не изменилась, а при ИР гипергликемия выросла в 1,6 раза. Через 4 ч гликемия в обеих группах стала физиологичной. Секрция β -клетками инсулина у пациентов без ИР увели-

чилась примерно в 3 раза, а при ИР – примерно в 8 раз. Концентрация С-пептида – достоверный тест секреции инсулина β -клетками. Между содержанием в плазме крови инсулина и С-пептида в ГТТ (через 2 ч) выявили позитивную коррелятивную зависимость с коэффициентами корреляции $r = 0,915$ и $r = 0,888$ для 1-й и 2-й групп пациентов соответственно. Физиологично инсулин блокирует высвобождение НЭЖК из подкожных адипоцитов, и их содержание в крови через 2 ч понижается примерно в 3 раза у пациентов обеих групп. Гипергликемия в ГТТ мало меняет содержание в плазме крови С14:0 миристиновой, С15:0 пентадеценовой, С18:0 стеариновой, С16:0 пальмитиновой НЖК и С16:1 пальмитолеиновой МЖК. Различия в концентрации этих ЖК между группами пациентов также невелики. Достоверно снизилось содержание С18:1 олеиновой МЖК и С18:2 линолевой ННЖК. Концентрация же других ННЖК и ПНЖК изменялась недостоверно. Можно полагать, что снижение содержания НЭЖК происходит за счет блокады инсулином освобождения из подкожных адипоцитов С18:1 олеиновой и С18:2 линолевой ЖК. Возможно, происходит и более быстрое поглощение их клетками.

Блокаду инсулином липолиза в подкожных адипоцитах можно оценить и при определении уровня ДС в плазме крови при титровании O_3 . На рис. 1 показано содержание ДС в липидном пуле плазмы крови в ГТТ у пациентов, определенное методом озонирования. Одновременно мы рассчитали суммарное содержание ДС в ЖК, исходя из данных хроматографического определения концентрации индивидуальных ЖК, зная в них количество ДС (рис. 2). Корреляция результатов, полученных двумя способами, оказалась достаточно высокой ($r = 0,851$), что свидетельствует о корректности оценки содержания ДС в плазме крови методом озонирования. Из сравнения рис. 1 и 2 можно заключить, что степень насыщенности плазмы крови определяется главным образом содержанием в ней МЖК, ННЖК и ПЖК. У большинства пациентов насыщенность плазмы крови через 2 ч ГТТ уменьшилась в основном за счет снижения содержания олеиновой и линолевой ЖК.

На рис. 3 приведена корреляционная зависимость между содержанием инсулина и ДС в контрольной точке

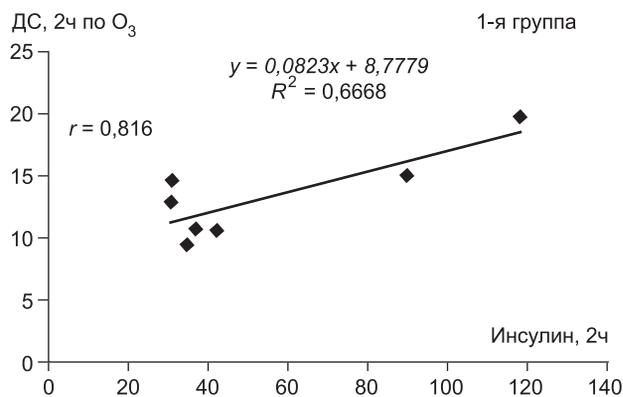


Рис. 3. Корреляция между содержанием инсулина (в ммоль/л) и ДС (в ммоль/л) в плазме крови в контрольной точке ГТТ у пациентов без симптома ИР.

ГТТ (2 ч). Видно, что чем сильнее вырос уровень инсулина, тем меньше понижено содержание ДС. Коэффициенты корреляции составили $r = 0,816$ для пациентов без ИР (рис. 3) и $r = 0,643$ с ИР. Это может означать, при ИР даже высокое содержание инсулина не может блокировать липолиз и физиологично понизить в плазме крови содержание ЖК и ДС. Если у пациентов без ИР понижается содержание олеиновой МЖК и линолевой ННЖК, то при симптоме ИР этого не происходит – инсулин не блокирует липолиз в подкожных адипоцитах, и это есть причина более высокого уровня глюкозы в контрольной точке ГТТ.

Для понимания происходящего *in vivo* в ГТТ важно выявить зависимость между секрецией инсулина и исходным содержанием в плазме крови пальмитиновой НЖК. Как оказалось, у 2-й группы пациентов с ИР более высокая секреция инсулина в ГТТ (в 1,5–2 раза) при равном начальном содержании пальмитиновой кислоты. Корреляция между содержанием инсулина в контрольной точке ГТТ и исходным содержанием пальмитиновой НЖК составила $r = 0,839$ и $r = 0,519$ для пациентов без ИР и с ИР соответственно.

Таким образом, мы показали, что действие инсулина в ГТТ можно достоверно оценить на основании изменения в плазме крови не только содержания глюкозы, но и концентрации ЖК и количества в них ДС, которое характеризует степень ненасыщенности ЖК липидов плазмы крови. Чем больше инсулина в контрольной точке ГТТ (2 ч), тем выше (в меньшей степени понижено) содержание ЖК и ДС в липидах плазмы крови. У пациентов без ИР секреция инсулина в среднем возрастает в 3 раза, в то время как у пациентов с ИР она увеличена в 8 раз, причем гиперсекреция инсулина достоверно коррелирует с исходным (натощак) содержанием пальмитиновой НЖК в плазменных липидах. В контрольной точке ГТТ содержание НЭЖК в плазме крови понижается в 3 раза. В пуле ЖК более выражено снижение содержания олеи-

новой МЖК и линоленовой ННЖК, причем оно происходит в большей степени у пациентов без ИР. Выявили достоверную корреляцию ($r = 0,851$) между содержанием ДС, определенным методом озонирования и рассчитанным исходя из концентрации индивидуальных ЖК с известным количеством ДС.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балаболкин М.И., Клебанова Е.М., Креминская В.М. *Эндокринология. Справочник поликлинического врача*. М., Медицина. 2005.
2. Титов В.Н. Филогенетическая теория общей патологии. Патогенез метаболических пандемий. *Сахарный диабет*. М., Инфра-М. 2014.
3. Титов В.Н., Лисицын Д.М. Содержание спиртов холестерина и глицерина в плазме крови зависит от числа двойных связей жирных кислот в пуле липидов липопротеинов. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2006; 11: 521–4.
4. Zhao X., Anddreas P., Fritsche J., Elcnerova M. et al. Changes of the plasma metabolome during an oral glucose tolerance test: is there more than glucose to look at? *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab.* 2009; 296(2): 384–93.
5. Ариповский А.В., Колесник П.О., Вежел М.И., Титов В.Н. Метод подготовки проб для газохроматографического определения жирных кислот без предварительной экстракции липидов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2012; 1: 3–6.
6. Разумовский С.Д., Заиков Г.Е. *Озон и его реакции с органическими соединениями*. М., Наука. 1974.
7. Гагарина А.Б., Евтеева Н.М. Кинетические закономерности расщепления ненасыщенных связей в процессе окисления бета-каротина. *Химическая физика*. 2002; 22(7): 41–9.
8. Дерффель К. et al. *Статистика в аналитической химии*. М., Мир: 1994.

REFERENCES

1. Balabolkin M.I., Klebanova E.M., Kreminskaya V.M. *Treatment of diabetes and its complications (guidelines for physicians)*. М., «Meditsina». 2005. (in Russian)
2. Titov V.N. Phylogenetic theory of general pathology. Pathogenesis of metabolic pandemics. *Diabetes*. М., INFRA-M. 2014. (in Russian)
3. Titov V.N., Lisizin D.M. The content of alcohols and glycerol cholesterol in blood plasma is dependent on the number of double bonds in the fatty acid pool lipoprotein lipids. *Byulluten 'eksperimental'noy biologii i meditsini*. 2006; 142(11): 521–4. (in Russian)
4. Zhao X., Anddreas P., Fritsche J., Elcnerova M. et al. Changes of the plasma metabolome during an oral glucose tolerance test: is there more than glucose to look at? *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab.* 2009; 296(2): 384–93.
5. Aripovskiy A.V., Kolesnik P.O., Vegdel M.I., Titov V.N. The method of sample preparation for gas chromatographic determination of fatty acids without prior lipid extraction. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2012; 1: 3–6. (in Russian)
6. Razumovskiy S.D., Zaikov G.E. *Ozone and its reaction with organic compounds*. М., Nauka. 1974. (in Russian)
7. Gagarina A.B., Evteeva N.M. Kinetic regularities spending unsaturated bonds in the oxidation of beta-carotene. *Chimicheskaya fizika*. 2003; 22(7): 41–9. (in Russian)
8. Derffel K. et al. *Statistics in Analytical Chemistry*. М., Mir: 1994.

Поступила 15.05.14

Received 15.05.14