

УДК 616-074:577.115.3

## ОМЕГА-3 ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ: ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ И РОЛЬ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ ОРГАНИЗМА ПАЦИЕНТОВ

*В.Е. Васьковский<sup>1, 2</sup>, Т.А. Горбач<sup>3</sup>, А.В. Есинов<sup>2</sup>, В.И. Светашев<sup>1</sup>, М.А. Яцкова<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>Институт биологии моря ДВО РАН (690041 г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17), <sup>2</sup>Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН (690022 г. Владивосток, пр-т 100 лет Владивостоку, 159), <sup>3</sup>Медицинское объединение ДВО РАН (690022 г. Владивосток, ул. Кирова, 95)

*Ключевые слова: жирные кислоты, кровь, экспресс-метод, диагностика.*

Для диагностики состояния пациентов по уровню высших омега-3 жирных кислот в их организме и контроля за действием препаратов этих кислот при приеме разработан экспресс-метод определения состава жирных кислот цельной крови. С помощью этого метода проанализировали кровь около 180 пациентов. Полученные данные варьировали в широких пределах. Начата работа по выявлению факторов, влияющих на состав жирных кислот крови. На добровольцах показано, что льняное масло не может рассматриваться как активный препарат омега-3 жирных кислот. Сделан вывод, что препараты этих кислот должны использоваться в рамках персонализированной медицины.

В первой публикации, посвященной исследованиям омега-3 жирных кислот в интересах медицины, мы на основе краткого обзора литературы показали, что эта проблема вызывает все больший интерес в мире, но особенно актуальна для России, которая по объему исследований в этой области существенно отстает от многих стран мира [1]. Так как в начальный период планировалось применение препаратов омега-3 жирных кислот для профилактики и лечения нейродегенеративных и некоторых других заболеваний, был проведен анализ 15 препаратов этих кислот, представленных на рынке России: исследовалось содержание липидных компонентов и главных жирных кислот. На основе полученных данных для дальнейшего использования был выбран препарат «Атероблок» [1]. Однако углубленная работа с информацией по проблеме заставила нас изменить план исследований. В литературе появляется все больше сведений о том, что пониженный уровень омега-3 жирных кислот в тканях человека, в первую очередь в крови, является фактором риска сердечно-сосудистых, неврологических, онкологических и ряда других заболеваний [1–3, 9, 10, 15]. Поэтому мы решили провести анализ жирных кислот крови пациентов, чтобы выявить среди них группу с факторами риска и, возможно, найти отличия в спектрах жирных кислот при различной патологии.

Уровень жирных кислот определяют как в цельной крови, так и в ее отдельных фракциях: сыворотке, плазме и эритроцитах [2, 3, 9, 10, 15]. Так как нам требовался экспрессный метод анализа, в качестве субстрата была выбрана цельная кровь. Уже после начала исследований появилась работа итальянских

авторов [11], которая подтвердила правильность выбора цельной крови, а также возможность анализа состава жирных кислот крови для диагностики некоторых заболеваний.

Настоящая статья посвящена модификации экспресс-метода определения содержания жирных кислот в цельной крови, а также результатам анализа проб крови с помощью разработанного подхода. Также начато выявление факторов, влияющих на состав жирных кислот крови пациентов, и приведены результаты нескольких опытов на добровольцах по выяснению индивидуальной реакции на прием растительных масел и препарата «Атероблок».

**Материал и методы.** Венозную кровь отбирали в пластиковые герметичные пробирки объемом 2 мл, содержащие в качестве антикоагулянта этилендиаминтетрауксусную кислоту (Greiner Bio-One Vacuette, Austria). Обработку крови проводили в течение 1–2 часов после отбора. Аликвоту крови (100 мкл) помещали в стеклянную пробирку с герметичной крышкой, покрытой тефлоном, добавляли 600 мкл 10 % раствора ацетилхлорида в метаноле, полученную смесь тщательно перемешивали до получения тонкой суспензии. Пробирку наполняли аргоном и помещали в термостат на 60 мин при температуре 90 °С. Затем к остывшей смеси добавляли 600 мкл дистиллированной воды. Полученные метиловые эфиры жирных кислот дважды экстрагировали 400 мкл гексана. Для более быстрого разрушения эмульсии, возникавшей во время экстракции, использовали центрифугу Micro-Centrifuge, type 320 (Poland) – 2000 об./мин, 1 мин. После этого гексановый экстракт переносили в отдельную стеклянную пробирку, растворитель удаляли в токе аргона, а метиловые эфиры растворяли в 100 мкл гексана.

Анализ метиловых эфиров жирных кислот проводили на газожидкостном хроматографе Shimadzu GC-2010 с пламенно-ионизационным детектором и капиллярной колонкой Supelcowax-10 (длина – 30 м, внутренний диаметр – 0,25 мм, температура колонки – 205 °С, температура испарителя – 250 °С). Жирные кислоты идентифицировали с помощью стандартов и по значениям эквивалентной длины цепи [13]. Для более строгой идентификации метиловых эфиров жирных кислот в ряде проб использовали газожидкостную хроматографию с масс-спектрометрией на

Васьковский Виктор Евгеньевич – д-р биол. наук, гл.н.с. лаборатории сравнительной биохимии ИБМ ДВО РАН и гл.н.с. лаборатории химии углеводов и липидов ТИБОХ ДВО РАН; e-mail: vev35@mail.ru

Таблица 1

Содержание главных жирных кислот в крови обследованных

Липидная формула	Содержание в крови, %		
	среднее	мин.	макс.
20:5n-3	1,84	0,30	6,26
22:6n-3	3,69	1,45	6,95
20:4n-6	8,57	4,15	13,82
16:0	21,31	16,86	28,69
16:1n-7	2,45	0,55	8,09
18:0	7,34	4,99	11,19
18:1n-9	14,24	9,05	21,60
18:1n-7	2,07	0,57	6,56
18:2n-6	26,44	16,63	38,41
18:3n-3	1,61	0,03	2,50
20:3n-6	1,07	0,16	1,92
22:4n-6	0,65	0,18	2,08
22:5n-3	1,02	0,43	1,88
<i>Соотношение</i>			
20:4n-6/20:5n-3	7,41	1,39	34,42
n-6/n-3	5,81	2,22	11,34

приборе Shimadzu GCMS-QP5050A с колонкой MDN-5S (температурная программа – 160 °С, затем 2 °С/мин до 250 °С).

**Результаты исследования и обсуждение полученных данных.** За основу экспресс-метода получения метиловых эфиров жирных кислот был взят предложенный недавно способ их получения из капли крови [4]. Разработанный нами метод включает в себя прямое метилирование жирных кислот в пробе цельной крови, экстракцию полученных метиловых эфиров, анализ их смеси методом газожидкостной хроматографии. Отличия нашего метода заключаются в использовании 10 % раствора ацетилхлорида вместо 5 %, добавлении воды к смеси после переэтерификации для лучшего разделения фаз, а также использовании микроцентрифуги для быстрого разрушения эмульсии. Для более строгой идентификации жирных кислот в ряде случаев мы использовали газожидкостную хроматографию с масс-спектрометрией полученных эфиров.

В упомянутой выше работе итальянских авторов [11] проанализирован состав жирных кислот цельной крови более тысячи пациентов, как здоровых, так и страдавших различными заболеваниями. Представители контрольной группы не употребляли в пищу источники высших омега-3 жирных кислот. Для оценки состояния обследуемых авторы ввели два показателя: соотношение количеств арахидоновой (20:4n-6) и эйкозапентаеновой (20:5n-3) кислот и суммарное соотношение жирных кислот двух серий – омега-6 и омега-3. Было установлено, что эти показатели менялись в зависимости от возраста пациентов, а также при различных заболеваниях.

Таблица 2

Изменения содержания некоторых ЖК в крови после однократного приема соевого\* и льняного\*\* масел

День анализа	Содержание главных жирных кислот, %						
	20:5n-3	22:6n-3	20:4n-6	16:0	18:1n-9	18:2n-6	18:3n-3
1-й*	5,05	5,50	5,50	20,20	14,80	28,00	0,80
4-й	3,00	4,50	5,00	19,70	14,30	35,95	0,50
5-й	2,70	5,00	4,90	21,70	16,20	30,90	0,60
6-й**	2,20	4,10	4,50	25,00	14,90	25,30	1,20
7-й	1,95	3,85	3,30	24,65	16,80	24,90	0,90
11-й	2,35	4,20	5,00	21,70	13,95	26,60	4,30

Нами для анализа жирных кислот крови было отобрано более 180 пациентов, сопоставимых по полу и возрасту, с нейродегенеративными (основная группа), сердечно-сосудистыми (контрольная группа) заболеваниями и патологией опорно-двигательного аппарата (группа сравнения), а также практически здоровые лица (табл. 1).

Первый вывод, который можно сделать по результатам наших исследований, – приморская популяция пациентов отличается по количественному составу жирных кислот крови от итальянской. Для оценки полученного массива информации требуется многофакторный анализ, установление корреляции состояния здоровья обследованных с образом жизни, включая питание. Для выполнения этой задачи одним из участников настоящего исследования (А.В. Есипов) разработана специальная компьютерная программа, с помощью которой полученную информацию начали обрабатывать.

Используя контроль над уровнем жирных кислот крови, мы провели на добровольцах несколько исследований, которые дали интересные и важные для дальнейшей работы результаты.

Хотя еще в 80-е годы XX века было показано, что  $\alpha$ -линоленовая кислота не может заменить для человека эйкозапентаеновую и докозагексаеновую кислоты, в последнее время все чаще в качестве препарата омега-3 жирных кислот рекомендуют льняное масло, состоящее примерно на 50 % из  $\alpha$ -линоленовой кислоты. Мы проверили влияние на состав жирных кислот приема 50 мл соевого масла, богатого линолевой кислотой и содержащего более 5%  $\alpha$ -линоленовой кислоты, и последующего приема такой же дозы льняного масла.

Прием масла, богатого линолевой или  $\alpha$ -линоленовой кислотой, снижал уровень высших полиеновых кислот, особенно серии омега-3, хотя через некоторое время их уровень несколько увеличивался по сравнению с минимальным (табл. 2). Полученные результаты подтвердили то, что уже известно в научной литературе: льняное масло не может считаться препаратом, увеличивающим уровень эйкозапентаеновой и докозагексаеновой кислот в организме человека.

Важные для практики результаты получены при приеме двумя испытуемыми с исходно низким уровнем эйкозапентаеновой кислоты в крови препарата «Атероблок». У первого пациента содержание эйкозапентаеновой кислоты, составлявшее примерно 0,4 % от суммы жирных кислот, не изменилось после 1-й недели приема препарата (по одной капсуле в день), а к концу 2-й недели увеличилось до 0,75 %. У второго пациента уровень этой кислоты в крови (примерно 0,5 %) не изменился в течение 70 дней приема препарата по аналогичной схеме. Однако через месяц после увеличения дозы до 2 капсул в день уровень эйкозапентаеновой кислоты повысился до 0,9 %.

Мы обратили внимание на то, что авторы недавних обзоров литературы, посвященных медицинским исследованиям омега-3 жирных кислот, говорят о том, что следует продолжать работы, увеличив число пациентов и используя плацебо, так как далеко не всегда положительное действие препаратов, показанное эпидемиологически и в опытах на животных, подтверждается в клинике [6–8, 14]. Мы полагаем, что такой подход, обычный при изучении действия различных лекарств и биологически активных добавок к пище, для препаратов омега-3 жирных кислот не вполне оправдан. Большинство лекарств и добавок не присутствуют в организме человека до их приема. Что касается высших омега-3 жирных кислот, то они в организме человека и других млекопитающих играют важную роль в функционировании центральной нервной системы, зрительного анализатора, репродуктивной и ряда других систем.

У человека уровень эйкозапентаеновой и докозагексаеновой кислот в тканях, включая кровь, определяется несколькими процессами помимо получения их с препаратами: это потребление в готовом виде как компонентов диеты, в которой присутствуют морские продукты, а также биосинтез из  $\alpha$ -линоленовой кислоты, присутствующей в ряде растительных масел и других продуктах [12]. Способность к такому биосинтезу варьирует у людей в широких пределах [5]. Поэтому, по нашему мнению, правильное использование препаратов омега-3 жирных кислот относится к сфере персонализированной медицины, когда препараты назначают с учетом результатов биохимических и генетических исследований, на фоне тщательно контролируемой диеты.

*Работа поддержана грантом ДВО РАН по программе «Фундаментальные и прикладные исследования в интересах медицины».*

#### References

1. Vaskovskij V.E., Gorbach T.A., Esipov A.V. et al. Preparations of the omega-3 fatty acids and their use in medicine, *Pacific Medical Journal*. 2010. No. 2. P. 16–20.
2. Albert C.M., Campos H., Stampfer M.J. et al. Blood levels of long-chain n-3 fatty acids and the risk of sudden death, *New Engl. J. Med.* 2002. Vol. 346, No. 15. P. 1113–1118.
3. Beydoun M.A., Kaufman J.S., Satia J.A. et al. Plasma n-3 fatty acids and the risk of cognitive decline in older adults: the atherosclerosis risk in communities study, *Am. J. Clin. Nutr.* 2007. Vol. 85, No. 4. P. 1103–1111.
4. Bicalho B., David F., Rumpel K. et al. Creating a fatty acid methyl ester database for lipid profiling in a single drop of human blood using high resolution capillary gas chromatography and mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*. 2008. Vol. 1211, No. 1–2. P. 120–128.
5. Burdge G.  $\alpha$ -Linolenic acid metabolism in men and women: nutritional and biological implications, *Current Opinion Clinical Nutr. Metabol. Care*. 2004. Vol. 7, No. 2. P. 137–144.
6. Di Minno M.N.D., Tremoli E., Tufano A. et al. Exploring newer cardioprotective strategies: omega-3 fatty acids in perspective, *Thromb. Haemostasis*. 2010. Vol. 104, No. 4. P. 664–680.
7. Huang T.L. Omega-3 fatty acids, cognitive decline, and Alzheimer's disease: A critical review and evaluation of the literature, *J. Alzheimers Disease*. 2010. Vol. 21, No. 3. P. 673–690.
8. Kirby A., Woodward A., Jackson S. Benefits of omega-3 supplementation for schoolchildren: review of the current evidence, *Brit. Educat. Res. J.* 2010. Vol. 36, No. 5. P. 699–732.
9. Kuriki K., Hirose K., Wakai K. et al. Breast cancer risk and erythrocyte compositions of n-3 highly unsaturated fatty acids in Japanese, *Int. J. Cancer*. 2007. Vol. 121, No. 2. P. 377–385.
10. Nogi A., Yang J.J., Li L.M. et al. Plasma n-3 polyunsaturated fatty acid and cardiovascular disease risk factors in Japanese, Korean and Mongolian workers, *J. Occupat. Health*. 2007. Vol. 49, No. 3. P. 205–216.
11. Rizzo A.M., Montorfano G., Negroni M. et al. A rapid method for determining arachidonic: eicosapentaenoic acid ratios in whole blood lipids: correlation with erythrocyte membrane ratios and validation in a large Italian population of various ages and pathologies, *Lipids in Health and Disease*. 2010. Vol. 9. Art. No. 7.
12. Simopoulos A.P. Genetic variants in the metabolism of omega-6 and omega-3 fatty acids: their role in the determination of nutritional requirements and chronic disease risk, *Exp. Biol. Med.* 2010. Vol. 235, No. 7. P. 785–795.
13. Stransky K., Jursik T., Vitek A. Standard equivalent chain length values of monoenic and polyenic (methylene-interrupted) fatty acids, *J. High Resol. Chromatogr.* 1997. Vol. 20, No. 3. P. 143–158.
14. Turner D., Shah P.S., Steinhart A.H. et al. Maintenance of remission in inflammatory bowel disease using omega-3 fatty acids (fish oil): A systematic review and meta-analyses, *Inflamm. Bowel Diseases*. 2011. Vol. 17, No. 1. P. 336–345.
15. Virtanen J.K., Mursu J., Voutilainen S., Tuomainen T.P. Serum long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and risk of hospital diagnosis of atrial fibrillation in men, *Circulation*. 2009. Vol. 120, No. 23. P. 2315–2321.

Поступила в редакцию 12.01.2010.

#### OMEGA-3 FATTY ACIDS: DIAGNOSTIC VALUE AND ROLE OF INDIVIDUAL FEATURES IN PATIENTS' ORGANISMS

V.E. Vaskovsky<sup>1,2</sup>, T.A. Gorbach<sup>3</sup>, A.V. Esipov<sup>2</sup>, V.I. Svetashev<sup>1</sup>, M.A. Yatskova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Marine Biology (17 Palchevskogo St. Vladivostok 690041 Russia), <sup>2</sup>Pacific Institute of Bioorganic Chemistry of the Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences (159 100 Year Anniversary of Vladivostok Av. Vladivostok 690022 Russia), <sup>3</sup>Medical Association of FEB RAS (95 Kirova St. Vladivostok 690022 Russia) Summary – The authors have created an express method for detecting fatty acid composition in whole blood intended to diagnose the state of patients by the level of omega 3 fatty acids in their organisms and monitor the effects from these acids when taking drugs. This method allowed testing blood taken from about 180 patients. The findings have varied in a wide range. The authors began working to identify factors appeared to have effect on the fatty acid composition in blood. In case of volunteers, it is evident that the linseed oil cannot be considered as active omega 3 fatty acid drug. As reported, the acid-containing drugs should be used as part of the personalised medicine.

**Key words:** fatty acids, blood, express method, diagnostics.

Pacific Medical Journal, 2012, No. 1, p. 23–25.