

СОДЕРЖАНИЕ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В ПОПЕРЕЧНО-ПОЛОСАТЫХ МЫШЦАХ ХРОНИЧЕСКИ-АЛКОГОЛИЗИРОВАННЫХ КРЫС

© 2018 г. Т.П. Кулагина*, Ю.В. Грицына**, А.В. Ариповский ***,
В.К. Жалимов*, И.М. Вихлянцев** ****

*Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 3
E-mail: tpkulagina@rambler.ru

**Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 3

E-mail: ivanvikhlyantsev@gmail.com

***Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии,
142279, Оболенск Московской области

E-mail: aripovsky@rambler.ru

****Пущинский государственный естественно-научный институт,
142290, Пущино Московской области, просп. Науки, 3

Поступила в редакцию 03.07.18 г.

Исследовано изменение содержания жирных кислот в сердечной и икроножной (m. gastrocnemius) мышцах крыс, хронически алкоголизованных в течение трех и шести месяцев с использованием двух методов алкоголизации – с использованием агара, содержащего 30% этанола (метод I), и с применением сбалансированного по питательным веществам жидкого корма, содержащего 5% этанола (метод II). Содержание жирных кислот в сердечной мышце контрольных животных значительно превышало таковое в икроножной мышце. У животных, алкоголизованных в течение трех месяцев по методу I, в сердечной мышце обнаружено значительное увеличение количества миристиновой, пентадекановой, пальмитиновой, стеариновой, дигомо-гамма-линоленовой и суммарного количества насыщенных жирных кислот, а также снижение количества ω -3-докозапентаеновой кислоты. После шести месяцев алкоголизации крыс по методу I наблюдалось увеличение количества пальмитолеиновой и ω -6-докозапентаеновой кислот, снижение количества стеариновой, эйкозодиеновой и арахидоновой кислот. Количество ω -3-докозапентаеновой кислоты в миокарде, как и после трех месяцев алкоголизации, оставалось сниженным по сравнению с контролем. В икроножной мышце крыс, алкоголизованных в течение трех месяцев по методу I, возрастало количество миристиновой, вакценовой, дигомо- γ -линоленовой и ω -6-докозапентаеновой кислот. Также наблюдалась тенденция к увеличению суммарного количества насыщенных, мононенасыщенных, ω -6-полиненасыщенных и общего количества жирных кислот. Через шесть месяцев алкоголизации происходило снижение содержания миристиновой, олеиновой, линолевой, α - и γ -линоленовой, эйкозодиеновой, суммарного количества насыщенных, ω -6-полиненасыщенных и суммарных всех жирных кислот. При алкоголизации животных в течение трех месяцев по методу II в сердечной и икроножной мышцах происходило достоверное увеличение количества дигомо- γ -линоленовой кислоты. Обсуждается роль этих изменений в развитии мышечных патологий.

Ключевые слова: хронически алкоголизованные крысы, жирные кислоты, поперечно-полосатые мышцы.

DOI: 10.1134/S0006302918050198

Известно, что длительное хроническое употребление алкоголя приводит к развитию симптомокомплекса алкоголь-индуцированного

поражения как скелетных (алкогольная миопатия), так и сердечной (алкогольная кардиомиопатия) мышц [1–3]. Развитие алкогольной миопатии сопровождается атрофией и слабостью скелетных мышц [2,3], тогда как развитие алкогольной кардиомиопатии проявляется развитием гипертрофии миокарда. Основные характеристики алкоголь-индуцированных наруше-

Сокращения: ЖК – жирные кислоты, ЭЭЖК – этиловые эфиры жирных кислот, ДГЛК – дигомо- γ -линоленовая кислота.

ний в мышцах успешно моделируются на животных, в частности на крысах [4]. Результаты недавно проведенных исследований показали, что повышенная активность кальций-активируемой протеазы кальпаина-1 вносит вклад в развитие атрофии путем снижения содержания гигантских белков саркомерного цитоскелета титина и небулина в скелетных мышцах крыс, хронически алкоголизированных в течение шести месяцев [5]. В сердечной мышце этих животных наблюдалась также тенденция к развитию атрофических, а не гипертрофических изменений [6]. В основе развития алкоголь-индуцируемых нарушений в мышцах лежит дисбаланс между синтезом и распадом белков [3,7]. Известно, что жирные кислоты (ЖК) и их метаболиты также участвуют в регуляции массы поперечно-полосатых мышц [8–11].

Поступающий в организм алкоголь метаболизируется двумя путями – окислительным и неокислительным. Более 90% этанола окисляется с помощью алкогольдегидрогеназы, цитохрома P450 и каталазы с образованием ацетальдегида, являющегося токсичным метаболитом для органов и тканей [12–15]. Ацетальдегид окисляется ацетальдегиддегидрогеназой до ацетата, метаболизирующегося во внепеченочных тканях, таких как мышцы, сердце и мозг [16], до ацетил-КоА, который может использоваться для синтеза жирных кислот.

По одному из двух основных неокислительных механизмов этанол превращается в этаноламин, используемый для синтеза фосфатидилэтанолamina. По второму неокислительному механизму с участием синтазы этиловых эфиров жирных кислот и ацил-КоА-этанол-О-ацил-трансферазы этанол этерифицируется эндогенными жирными кислотами с образованием этиловых эфиров жирных кислот (ЭЭЖК). Этиловые эфиры и триацилглицериды жирных кислот обнаружены в большом количестве в сердечной и скелетных мышцах [17–19].

Ферменты синтеза ЭЭЖК обнаружены в растворимой и микросомальной фракциях многих тканей. От активности гидролаз, катализирующих расщепление эфирной связи внутри молекулы ЭЭЖК с образованием этанола и ЖК, зависит количество ЭЭЖК. Гидролазы ЭЭЖК и сами ЭЭЖК находятся в липидных каплях. Формирование липидных капель происходит на эндоплазматическом ретикулуме. Липидные капли являются местом временного либо длительного хранения липидов преимущественно в виде триацилглицеридов и эфиров холестерина [20,21]. Повышенное содержание триацилглицеридов обнаружено в образцах скелетной мышцы vastus lateralis пациентов с миопатией, упот-

ребляющих этанол в течение длительного периода. При этом преобладающими из ЖК в составе триацилглицеридов были пальмитиновая и олеиновая кислоты. Гистологический анализ m. vastus lateralis пациентов с миопатией выявил повышенное содержание липидных капель как между мышечными фибриллами, так и на сарколемме внутри фибрилл [22].

Накопление липидных капель обнаружено и в кардиомиоцитах крыс, получавших алкоголь в составе питьевой воды [17]. Было показано, что липидные капли находились в непосредственном контакте с митохондриями. Липидный анализ ткани сердца показал умеренное накопление триацилглицеридов и значительное (в 12 раз) увеличение ЭЭЖК [17]. Известно, что токсические эффекты ЭЭЖК проявляются в ингибировании клеточной пролиферации, дестабилизации лизосом, деполяризации митохондрий, а также индукции апоптоза. В настоящее время точно неизвестно, токсичны ли сами ЭЭЖК или высвобождающиеся при их гидролизе ЖК. Полагают, что именно ЖК, высвобождающиеся при гидролизе ЭЭЖК, приводят к клеточной дисфункции [20,21].

Проведенные нами ранее исследования выявили развитие атрофических изменений, сопровождающихся повышенным протеолизом титина и небулина, в поперечно-полосатых мышцах хронически-алкоголизированных крыс [4, 5]. Нельзя исключить, что развитию атрофии могли предшествовать изменения жирнокислотного состава в мышечной ткани.

В связи с этим целью данного исследования являлось определение содержания жирных кислот в сердечной и скелетной (m. gastrocnemius) мышцах крыс, алкоголизированных в течение трех и шести месяцев.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Хроническая алкоголизация крыс. В работе использовали самцов крыс линии Wistar. Масса каждого животного в начале эксперимента составляла 150 ± 5 г. Животных содержали в отдельных клетках в условиях вивария ИТЭБ РАН и ИБК РАН (Пушино, Московская обл.). Проведение опытов на животных было одобрено комиссиями по биомедицинской этике ИТЭБ РАН и ИБК РАН. Хроническую алкоголизацию животных проводили по двум методам: по методу «I» [23] с использованием 10%-го раствора этанола в воде, а также 30%-го раствора этанола в агаровых блоках в течение трех и шести месяцев (по пять животных в каждой из контрольной и алкогольной групп, среднесуточное потребление этанола составило

26,6 ± 3,0 г·кг⁻¹·день⁻¹ и 23,4 ± 2,0 г·кг⁻¹·день⁻¹ соответственно) и методу «II» [24] с использованием сбалансированного по питательным веществам жидкого корма, содержащего 5% этанола, в течение трех месяцев (по четыре крысы в контрольной и алкогольной группах, среднесуточное потребление этанола составило 19,1 ± 2,0 г·кг⁻¹·день⁻¹). В крови крыс, алкоголизованных по методу «II», содержание этанола, измеренное с помощью набора Ethanol FS (DiaSys), составило 25,9 ± 4,8 мМ/л. Определение этанола в крови крыс, алкоголизованных по методу «I» [23], не проводилось.

При моделировании алкогольной миопатии по методу «I» с использованием агаровых блоков привыкание животных к алкоголю развивали постепенно, увеличивая содержание этанола в питьевой воде и агаре. В частности, в течение первых трех суток содержание этанола в воде составляло 5%, после трех суток и до окончания эксперимента – 10%. Содержание этанола в агаре увеличивали на 5% каждые трое суток (до конечной концентрации спирта 30%). После завершения периода хронической алкоголизации животных взвешивали и выводили из эксперимента путем эвтаназии, используя препарат Золетил (Virbac Sante Animale, Франция) из расчета 25 мг вещества на 1 кг массы животного, что трехкратно превышает терапевтическую дозу (7–8 мг/кг). В дальнейшем использовали миокард левого желудочка и *m. gastrocnemius* (икроножную мышцу). Мышцы замораживали в жидком азоте и хранили при температуре –75°C.

Определение состава и количества жирных кислот в исследуемых мышцах. Для определения жирнокислотного состава были взяты образцы поперечно-полосатых мышц, использованных ранее для исследований алкоголь-индуцируемых изменений в мышечных белках [5,6]. Гомогенизацию образцов мышечной ткани проводили в жидком азоте. Навеску гомогената (30–40 мг) в 0,9%-м растворе NaCl, содержащем 0,5% ионола (2,6-ди-*трет*-4-метилфенола), высушивали в ротационно-вакуумном концентраторе SpeedVac (Savant Instruments, США). Метилловые эфиры высших ЖК получали по методу, описанному ранее [25]. ЖК определяли на аналитическом газовом хроматографе GC 3900 (Varian, США) с пламенно-ионизационным детектором (температура детектора 260°C). Для разделения использовали кварцевую капиллярную колонку (15 м × 0,25 мм × 0,3 мкм) с привитой неподвижной фазой (Supelco, США). Температурная программа анализа составляла: 90°C (0,5 мин) – 240°C (5 мин) со скоростью 6°C в

мин. Анализ данных проводили с помощью программного обеспечения мультихром-1.5х (ЗАО «Амперсед», Россия). Концентрацию ЖК определяли с использованием внутреннего стандарта с предварительным вычислением соответствующих калибровочных коэффициентов из хроматограмм смеси определяемых ЖК с маргариновой кислотой (C_{17:0}). Для каждого образца рассчитывали абсолютное и относительное содержание индивидуальных ЖК.

Статистическая обработка данных. Достоверность полученных результатов между группами оценивали с помощью непараметрического *U*-критерия Манна–Уитни. Различия между группами считали достоверными при $P \leq 0,05$. Все данные представлены как среднее + стандартная ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Состав и количество ЖК в сердечной и икроножной мышцах контрольных животных и крыс, алкоголизованных в течение трех и шести месяцев по методу «I», представлены на рис. 1 и 2 и в табл. 1 и 2. Было обнаружено, что в миокарде контрольных животных общее содержание ЖК было выше (примерно в два раза), чем таковое в икроножной мышце (табл. 1 и 2).

В сердечной мышце крыс, алкоголизованных в течение трех месяцев по методу «I», обнаружено достоверное увеличение содержания насыщенных миристиновой, пентадекановой, пальмитиновой, стеариновой, а также полиненасыщенной дигомо-γ-линоленовой (ДГЛК) кислот и, соответственно, увеличение суммарного количества насыщенных ЖК (рис. 1). При этом наблюдалось снижение ω-3-докозапентаеновой кислоты.

После алкоголизации животных в течение шести месяцев наблюдалось увеличение содержания пальмитолеиновой и ω-6-докозапентаеновой кислот (рис. 1). При этом наблюдалось снижение количества стеариновой, эйкозодиеновой, арахидоновой и ω-3-докозапентаеновой кислот в миокарде алкоголизованных крыс.

В икроножной мышце крыс, алкоголизованных в течение трех месяцев по методу «I», обнаружено увеличение количества миристиновой, вакценовой, ДГЛК и ω-6-докозапентаеновой кислот (рис. 2). При этом наблюдалась тенденция к увеличению количества пальмитиновой, пальмитолеиновой, олеиновой и линолевой кислот. Эта тенденция прослеживалась также для суммарного количества насыщенных,

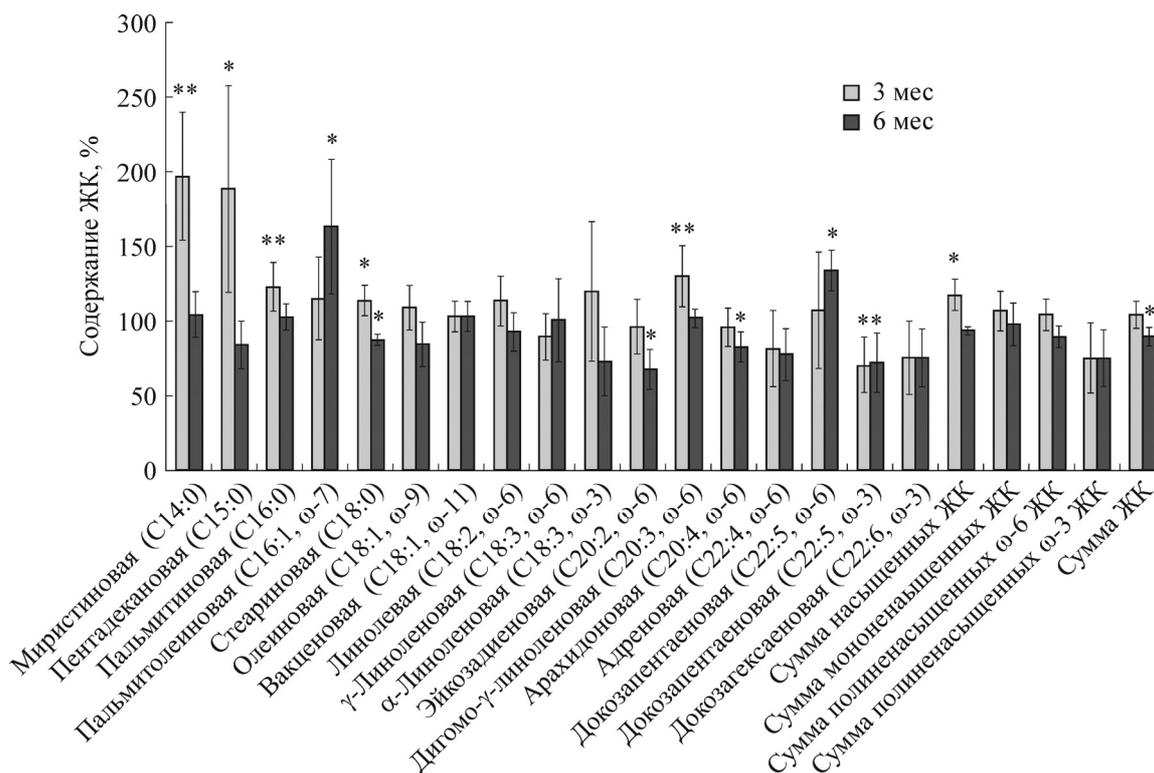


Рис. 1. Жирнокислотный состав в миокарде крыс, алкоголизованных в течение трех и шести месяцев по методу «I» [23]. Контрольные значения содержания ЖК приняты за 100%. ** – $p \leq 0,01$, * – $p \leq 0,05$.

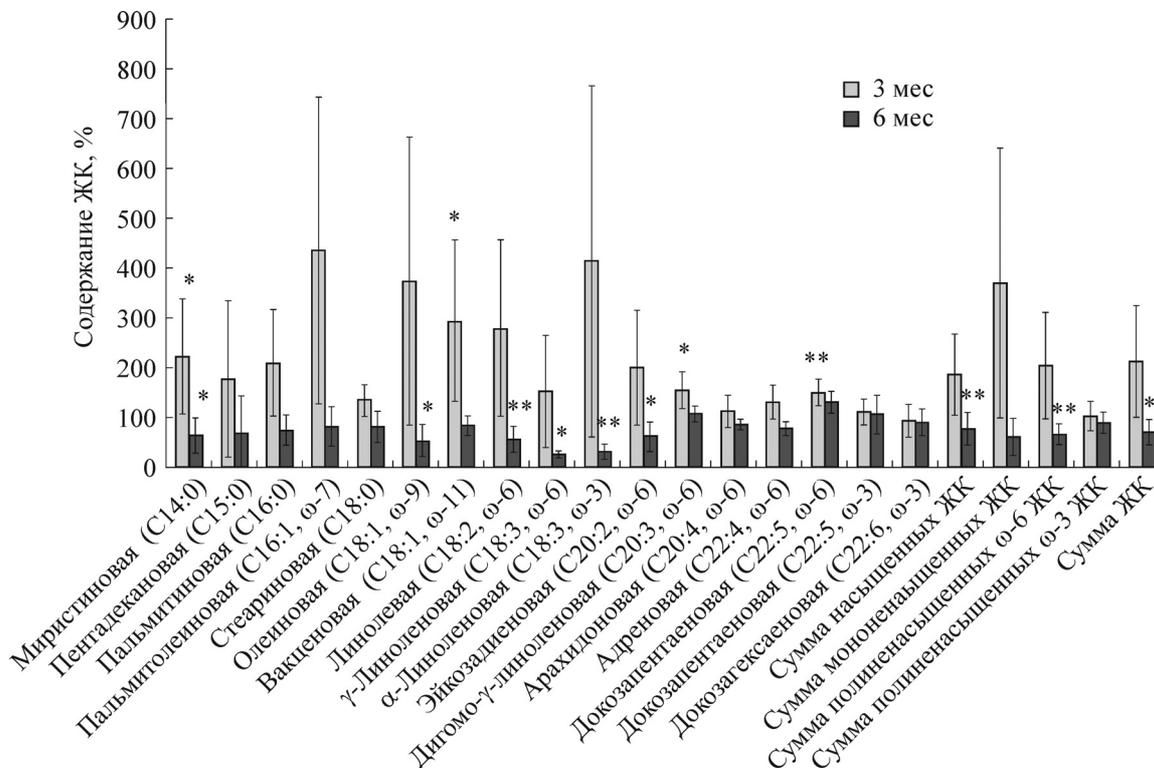


Рис. 2. Жирнокислотный состав в икроножной мышце крыс, алкоголизованных в течение трех и шести месяцев по методу «I» [23]. Контрольные значения содержания ЖК приняты за 100%. ** – $p \leq 0,01$, * – $p \leq 0,05$.

Таблица 1. Жирнокислотный состав (в мкг/мг ткани) в миокарде контрольных крыс

Жирная кислота	Содержание	
	Контроль (3 мес.)	Контроль (6 мес.)
Миристиновая (C _{14:0})	0,035 ± 0,007	0,072 ± 0,026
Пентадекановая (C _{15:0})	0,013 ± 0,003	0,025 ± 0,007
Пальмитиновая (C _{16:0})	1,943 ± 0,124	2,436 ± 0,283
Пальмитолеиновая (C _{16:1, ω-7})	0,119 ± 0,014	0,157 ± 0,042
Стеариновая (C _{18:0})	3,806 ± 0,266	3,915 ± 0,343
Олеиновая (C _{18:1, ω-9})	0,794 ± 0,103	1,097 ± 0,169
Вакценовая (C _{18:1, ω-11})	0,893 ± 0,043	0,878 ± 0,104
Линолевая (C _{18:2, ω-6})	4,553 ± 0,487	4,928 ± 0,267
γ-Линоленовая (C _{18:3, ω-6})	0,039 ± 0,009	0,0358 ± 0,00914
α-Линоленовая (C _{18:3, ω-3})	0,015 ± 0,0029	0,0302 ± 0,009
Эйкозодиеновая (C _{20:2, ω-6})	0,078 ± 0,010	0,068 ± 0,018
Дигомо-γ-линоленовая (C _{20:3, ω-6})	0,069 ± 0,005	0,064 ± 0,012
Арахидоновая (C _{20:4, ω-6})	4,407 ± 0,356	4,045 ± 0,558
Адреновая (C _{22:4, ω-6}) (докозатетраеновая)	0,385 ± 0,028	0,263 ± 0,075
Докозапентаеновая (C _{22:5, ω-6})	0,639 ± 0,033	0,287 ± 0,082
Докозапентаеновая (C _{22:5, ω-3})	0,345 ± 0,065	0,285 ± 0,065
Докозагексаеновая (C _{22:6, ω-3})	2,342 ± 0,195	2,328 ± 0,634
Сумма насыщенных ЖК	5,797 ± 0,379	6,448 ± 0,527
Сумма мононенасыщенных ЖК	1,806 ± 0,134	2,131 ± 0,288
Сумма полиненасыщенных ω-6-ЖК	10,169 ± 0,793	9,689 ± 0,975
Сумма полиненасыщенных ω-3-ЖК	2,702 ± 0,221	2,643 ± 0,703
Сумма всех ЖК	20,4758 ± 1,499	20,911 ± 2,216

Примечание. Соответствующие опытные животные были алкоголизованы в течение трех и шести месяцев по методу «I» [23]; * – $p \leq 0,05$.

мононенасыщенных, ω-6-полиненасыщенных и общего количества ЖК (рис. 2).

После алкоголизации животных в течение шести месяцев обнаружено снижение общего содержания ЖК (рис. 2). При этом наблюдалось снижение содержания миристиновой, олеиновой, линолевой, γ- и α-линоленовой, эйкозодиеновой кислот, а также общего количества насыщенных и ω-6-полиненасыщенных ЖК.

Состав и количество ЖК в миокарде и икроножной мышце контрольных животных и крыс, алкоголизованных в течение трех месяцев по методу «II», представлены в табл. 3. В исследуемых поперечно-полосатых мышцах контрольных крыс, принимавших жидкий корм, не содержащий алкоголя, содержание мононенасыщенных олеиновой и вакценовой кислот было выше, чем таковое в мышцах контрольных животных с агаровой диетой (табл. 1–3). Это может быть связано с высоким содержа-

нием мононенасыщенных жиров в жидком корме.

В мышцах крыс, алкоголизованных в течение трех месяцев по методу «II», обнаружено увеличение количества ДГЛК (табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известны данные, что при хроническом потреблении алкоголя накопление в тканях этиловых эфиров насыщенной пальмитиновой и мононенасыщенной олеиновой кислот имело менее выраженные токсические последствия, тогда как образование этиловых эфиров с полиненасыщенными ЖК приводило к тяжелому поражению печени вследствие перекисного окисления ненасыщенных ЖК [26,27]. В частности, показано, что увеличение насыщенных ЖК в рационе крыс, получавших алкоголь, повышало устойчивость мембран печени к окислительному стрессу, снижая алкогольное

Таблица 2. Жирнокислотный состав (в мкг/мг ткани) в икроножной мышце контрольных крыс

Жирная кислота	Содержание	
	Контроль (3 мес.)	Контроль (6 мес.)
Миристиновая (C _{14:0})	0,133 ± 0,0467	0,159 ± 0,049
Пентадекановая (C _{15:0})	0,061 ± 0,042	0,079 ± 0,042
Пальмитиновая (C _{16:0})	2,358 ± 0,383	2,819 ± 0,604
Пальмитолеиновая (C _{16:1, ω-7})	0,212 ± 0,085	0,277 ± 0,179
Стеариновая (C _{18:0})	1,192 ± 0,057	1,121 ± 0,123
Олеиновая (C _{18:1, ω-9})	1,104 ± 0,399	1,778 ± 0,948
Вакценовая (C _{18:1, ω-11})	0,243 ± 0,039	0,337 ± 0,115
Линолевая (C _{18:2, ω-6})	2,028 ± 0,419	3,335 ± 1,448
γ-Линоленовая (C _{18:3, ω-6})	0,015 ± 0,006	0,046 ± 0,075
α-Линоленовая (C _{18:3, ω-3})	0,023 ± 0,010	0,057 ± 0,039
Эйкозодиеновая (C _{20:2, ω-6})	0,039 ± 0,007	0,055 ± 0,028
Дигомо-γ-линоленовая (C _{20:3, ω-6})	0,046 ± 0,011	0,056 ± 0,027
Арахидоновая (C _{20:4, ω-6})	1,451 ± 0,286	1,304 ± 0,262
Адреновая (C _{22:4, ω-6}) (докозатетраеновая)	0,102 ± 0,015	0,106 ± 0,033
Докозопентаеновая (C _{22:5, ω-6})	0,133 ± 0,018	0,068 ± 0,019
Докозопентаеновая (C _{22:5, ω-3})	0,134 ± 0,013	0,114 ± 0,007
Докозагексаеновая (C _{22:6, ω-3})	0,852 ± 0,053	0,910 ± 0,177
Сумма насыщенных ЖК	3,743 ± 0,455	4,179 ± 0,679
Сумма моносенасыщенных ЖК	1,559 ± 0,464	2,392 ± 1,226
Сумма полиненасыщенных ω-6-ЖК	3,814 ± 0,569	4,970 ± 1,695
Сумма полиненасыщенных ω-3-ЖК	1,016 ± 0,065	1,082 ± 0,173
Сумма всех ЖК	10,133 ± 1,447	12,623 ± 3,486

Примечание. Соответствующие опытные животные были алкоголизированы в течение трех и шести месяцев по методу «I» [23].

повреждение печени [28]. Однако было обнаружено, что накапливающиеся в тканях насыщенные ЖК обладают провоспалительными свойствами, поскольку инкубация кардиомиоцитов (H9C2) с пальмитиновой кислотой приводила к постепенному накоплению внутриклеточных липидов и гибели клеток [29]. На культуре мышечных клеток C₂C₁₂ показано, что повышенный уровень пальмитиновой кислоты индуцировал секрецию провоспалительного интерлейкина-6 и фактора некроза опухоли α [30, 31]. Показано также, что обработка клеток C₂C₁₂ насыщенными пальмитиновой и стеариновой кислотами индуцировала экспрессию циклооксигеназы-2 (СОХ-2) и последующее образование провоспалительного простагландина E₂, при этом ненасыщенные ЖК подавляли экспрессию СОХ-2, индуцированную пальмитиновой кислотой [32]. Индуцированный пальмитиновой кислотой стресс эндоплазматического

ретикулума, приводящий к активации каспаз, протеолизу и автофагии, также предотвращался ненасыщенными докозагексаеновой и олеиновой кислотами [33,34]. Олеиновая кислота также предотвращала повышенное образование активных форм кислорода митохондриями, подавляла экспрессию мРНК фактора некроза опухоли-α и интерлейкина-6 в миоцитах [35].

Полагают, что противоположные эффекты олеиновой и пальмитиновой кислот связаны с накоплением пальмитата в составе диацилглицеридов, а олеата в составе триацилглицеридов. Гистологические исследования показали, что обработка кардиомиобластов (H9C2) пальмитиновой или олеиновой кислотами приводит к разным результатам. В инкубированных с олеиновой кислотой клетках липидные капли имели более четкие очертания. В клетках, инкубированных с пальмитиновой кислотой, нарушалось образование липидных капель, которые имели

Таблица 3. Жирнокислотный состав (в мкг/мг ткани) в миокарде и икроножной мышце контрольных и опытных крыс, алкоголизованных в течение трех месяцев по методу «II» [24]

Жирная кислота	Содержание в миокарде		Содержание в икроножной мышце	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
Миристиновая (C _{14:0})	0,129 ± 0,012	0,162 ± 0,013	0,107 ± 0,015	0,099 ± 0,010
Пентадекановая (C _{15:0})	–	–	–	–
Пальмитиновая (C _{16:0})	2,286 ± 0,084	2,569 ± 0,222	2,338 ± 0,323	2,405 ± 0,245
Пальмитолеиновая (C _{16:1, ω-7})	0,058 ± 0,009	0,077 ± 0,016	0,095 ± 0,037	0,086 ± 0,019
Стеариновая (C _{18:0})	3,815 ± 0,235	3,931 ± 0,305	1,107 ± 0,132	1,225 ± 0,188
Олеиновая (C _{18:1, ω-9})	2,738 ± 0,431#	2,635 ± 0,167	3,459 ± 0,712#	3,025 ± 0,394
Вакценовая (C _{18:1, ω-11})	2,652 ± 0,199#	2,556 ± 0,366	1,612 ± 0,234#	1,865 ± 0,233
Линолевая (C _{18:2, ω-6})	0,009 ± 0,003	0,008 ± 0,004	0,005 ± 0,003	0,009 ± 0,004
γ-Линоленовая (C _{18:3, ω-6})	0,012 ± 0,003	0,010 ± 0,001	0,013 ± 0,004	0,012 ± 0,002
α-Линоленовая (C _{18:3, ω-3})	0,019 ± 0,013	0,024 ± 0,006	0,023 ± 0,005	0,024 ± 0,006
Эйкозодиеновая (C _{20:2, ω-6})	0,042 ± 0,006	0,042 ± 0,007	0,026 ± 0,003	0,032 ± 0,012
Дигомо-γ-линоленовая (C _{20:3, ω-6})	0,053 ± 0,007	0,080 ± 0,016*	0,032 ± 0,007	0,051 ± 0,016*
Арахидоновая (C _{20:4, ω-6})	3,993 ± 0,155	3,888 ± 0,356	1,163 ± 0,165	1,261 ± 0,162
Эйкозопентаеновая (C _{20:5, ω-3})	0,004 ± 0,002	0,004 ± 0,0004	0,004 ± 0,001	0,007 ± 0,003
Адреновая (C _{22:4, ω-6}) (докозатетраеновая)	0,251 ± 0,027	0,231 ± 0,039	0,095 ± 0,019	0,111 ± 0,036
Докозопентаеновая (C _{22:5, ω-6})	0,892 ± 0,245	1,147 ± 0,089	0,249 ± 0,076	0,389 ± 0,135
Докозопентаеновая (C _{22:5, ω-3})	0,118 ± 0,012	0,130 ± 0,027	0,076 ± 0,013	0,084 ± 0,023
Докозагексаеновая (C _{22:6, ω-3})	1,035 ± 0,075	1,074 ± 0,176	0,484 ± 0,093	0,507 ± 0,073
Сумма насыщенных ЖК	6,229 ± 0,291	6,66 ± 0,474	3,551 ± 0,451	3,729 ± 0,407
Сумма моноснасыщенных ЖК	5,449 ± 0,439	5,269 ± 0,541	5,167 ± 0,959	4,000 ± 0,519
Сумма полиненасыщенных ω-6-ЖК	5,251 ± 0,410	5,403 ± 0,418	1,582 ± 0,2332	1,865 ± 0,356
Сумма полиненасыщенных ω-3-ЖК	1,177 ± 0,093	1,231 ± 0,205	0,585 ± 0,107	0,619 ± 0,103
Сумма всех ЖК	18,105 ± 0,846	18,563 ± 1,524	8,782 ± 5,637	11,188 ± 1,234

Примечание. # – Различия достоверны по отношению к количеству олеиновой и вакценовой кислот в миокарде и икроножной мышцах крыс, являвшихся контролем для животных, алкоголизованных в течение трех месяцев по методу «I».

диффузную окраску. Их количество было значительно меньше, несмотря на повышенное накопление внутриклеточных липидов. Индуцированное пальмитиновой кислотой накопление липидов на эндоплазматическом ретикулуме вызывало его сильный стресс, приводящий к гибели клеток [36].

Обнаруженное в наших экспериментах повышенное содержание насыщенных ЖК в миокарде после трех месяцев алкоголизации крыс, возможно, является защитной реакцией клеток от перекисного окисления липидов, к которому устойчивы насыщенные ЖК. Однако миокард и икроножная мышца содержат значительное количество пальмитиновой кислоты, обладающей провоспалительными свойствами. Можно полагать, что повышенное количество этой ки-

слоты в миокарде и тенденция к ее повышению в икроножной мышце крыс, алкоголизованных в течение трех месяцев по методу «I», внесли вклад в развитие атрофии икроножной мышцы [5] и выявленную тенденцию к развитию атрофии миокарда [6] у крыс, алкоголизованных в течение шести месяцев. Обнаруженное нами снижение количества ω-3-докозопентаеновой кислоты в миокарде крыс, алкоголизованных по методу «I» в течение трех и шести месяцев (рис. 1), по-видимому, связано с необходимостью поддержания на определенном уровне количества докозагексаеновой кислоты, предшественником синтеза которой она является. Метаболиты докозагексаеновой кислоты обладают противовоспалительными свойствами [37,38], что важно для противодействия вос-

палительным процессам, вызываемым пальмитиновой кислотой. Возможно, с этим связано отсутствие негативных изменений и развития атрофии в образцах сердечной мышцы крыс, алкоголизованных в течение трех месяцев [6].

Снижение количества стеариновой кислоты после шести месяцев алкоголизации крыс, по-видимому, обусловлено увеличением количества пальмитолеиновой кислоты с помощью Δ^9 -десатуразы. Повышенный уровень пальмитолеиновой кислоты в миокарде, обнаруженный в наших экспериментах, возможно, является предвестником его патологических изменений. Полагают, что повышенный уровень пальмитолеиновой кислоты в лимфоцитах является маркером полимиозита, характеризующегося прогрессирующей мышечной слабостью и воспалением мышц [39].

Уменьшение количества эйкозодиеновой и арахидоновой кислот в сердечной мышце крыс после их алкоголизации в течение шести месяцев, возможно, связано с повышенным содержанием ω -6-докозапентаеновой кислоты. Эти кислоты являются предшественниками в цепи синтеза ω -6-докозапентаеновой кислоты. Показано, что ω -6- и ω -3-формы докозапентаеновой кислоты являются сильными ингибиторами индуцированного сфингозилфосфорилхолином спазма гладких мышц сосудов и, в частности, гладкой мускулатуры коронарной артерии человека [40]. Вероятно, увеличение количества ω -6-докозапентаеновой кислоты в миокарде после шести месяцев алкоголизации является защитной реакцией сердечной мышцы против негативного влияния алкоголя.

Увеличение количества миристиновой кислоты в икроножной мышце после трех месяцев алкоголизации крыс может быть связано с усилением включения глюкозы в клетки мышечной ткани. На культуре клеток C_2C_{12} показано, что миристиновая кислота, увеличивая экспрессию δ -диацил-киназы, усиливает инсулин-независимое включение глюкозы в миоциты. Пальмитиновая и стеариновая кислоты, достоверное увеличение количества которых в наших экспериментах не выявлено, такого влияния не оказывали [41]. Кроме того, показано, что миристоилирование пентапептида Gblin, являющегося ингибитором убиквитин-лигазы Cbl-b, предотвращало стимулируемую глюкокортикоидами атрофию скелетных мышц [42]. Вероятно, увеличение количества миристиновой кислоты в этот период алкоголизации животных является защитной реакцией против атрофических изменений в икроножной мышце [43].

Причина повышенного содержания вакценовой кислоты в икроножной мышце крыс, алкоголизованных в течение трех месяцев по методу «I», не ясна. Метаболические эффекты вакценовой кислоты мало изучены. Известно, что *cis*-вакценовая кислота синтезируется из пальмитолеиновой кислоты с помощью фермента элонгазы-5. На клетках HepG2 показано, что эта кислота участвует в регуляции mTORC2-Akt-FoxO1 сигнального пути [44].

Снижение количества олеиновой и линолевой кислот в икроножной мышце после шести месяцев алкоголизации крыс может быть связано с атрофическими изменениями в икроножной мышце. Показано, что олеиновая и линолевая кислоты действуют как эндогенные лиганды рецептора 1 свободных жирных кислот и индуцируют пролиферацию клеток гладкой мускулатуры трахеи человека [45]. Снижение количества этих кислот свидетельствует о снижении пролиферации и согласуется с ранее полученными данными об атрофических изменениях в этой мышце [5]. Пониженное количество α -линоленовой кислоты, которая является предшественником синтеза докозапентаеновой и докозагексаеновой кислот, по-видимому, связано с необходимостью поддержания на определенном уровне количества этих кислот. Снижение количества эйкозодиеновой кислоты после шести месяцев алкоголизации животных может быть связано со снижением количества линолевой кислоты, которая является предшественником ее синтеза.

Отличительной особенностью исследованных нами мышц у крыс, получавших алкоголь в течение трех месяцев и по методу «I», и по методу «II», является достоверное возрастание количества ДГЛК. ДГЛК обладает разнообразными функциями в клеточном метаболизме. Метаболиты этой кислоты обладают преимущественно противовоспалительными свойствами. Увеличение количества ДГЛК по отношению к арахидоновой кислоте свидетельствует об уменьшении эндогенного продуцирования арахидоновой кислоты Δ^5 -десатуразой и снижении синтеза ее провоспалительных метаболитов, таких как простагландины второй серии и лейкотриены четвертой серии. ДГЛК является субстратом для синтеза COX-2 простагландинов первой серии, обладающих противовоспалительными свойствами. Введение в рацион человека и животных этой кислоты избирательно увеличивало синтез простагландинов, в частности противовоспалительного простагландина E_1 . Связываясь через G-белок с соответствующими рецепторами, простагландин E_1 запускает сигнальные механизмы, стимулирующие экс-

прессию ряда генов путем активации транскрипционных факторов, вызывая положительные эффекты при ряде заболеваний [46,47]. В экспериментах на мышах показано кардиопротекторное влияние ДГЛК в результате ее окисления 12-липоксигеназой с образованием 12-(S)-гидрокси-8Z,10E,14Z-эйкозатриеновой кислоты (12(S)-HETE), ингибирующей активацию тромбоцитов и тромбоз сосудов [48]. Помимо простагландинов серии 1 ДГЛК превращается в лейкотриены серии 3, которые также обладают противовоспалительными свойствами. Эти лейкотриены также ингибируют действие метаболитов, полученных из арахидоновой кислоты [46]. Увеличение количества ДГЛК во всех образцах мышечной ткани после трех месяцев алкоголизации животных (рис. 1 и 2, табл. 3), по-видимому, свидетельствует об активизации защитного механизма, общего для всех групп мышц. Это предположение согласуется с данными об отсутствии атрофических изменений и повышенного протеолиза титина и небулина в миокарде и икроножной мышце крыс, алкоголизованных в течение трех месяцев [6,43].

Следует заметить, что в сердечной мышце и контрольных, и алкоголизованных в течение трех месяцев по методу «II» крыс обнаружено повышенное содержание мононенасыщенных олеиновой и вакценовой кислот (табл. 3) по сравнению с их содержанием в миокарде и икроножной мышцах в течение трех месяцев по методу «I» (рис. 1 и 2, табл. 1 и 2). Показано, что олеиновая кислота может влиять на экспрессию генов [49]. В наших экспериментах ее повышенное содержание наблюдалось на фоне повышенной экспрессии гена титина в миокарде и икроножной мышце хронически-алкоголизованных по методу «II» крыс [6,43].

Результаты исследования позволяют предположить, что изменение количества ЖК при хронической алкогольной интоксикации предшествует развитию атрофических и других негативных изменений в поперечно-полосатых мышцах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. C. H. Lang, R. A. Frost, A. D. Summer, and T. C. Vary, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **37** (10), 2180 (2005).
2. Т. Л. Немировская, Б. С. Шенкман, О. Е. Зиновьева и др., *Физиология человека* **41** (6), 65 (2015).
3. B. S. Shenkman, S. P. Belova, O. E. Zinovyeva and al., *Alcohol Clin. Exp. Res.* **42** (1), 41 (2018).
4. Ю. В. Грицына, Н. Н. Салмов, И. М. Вихлянец и др., *Молекуляр. биология* **47** (6), 996 (2013).
5. Y. V. Gritsyna, N. N. Salmov, A. G. Bobylev, et al., *Alcohol Clin. Exp. Res.* **41** (10), 1686 (2017).
6. Ю. В. Грицына, Н. Н. Салмов, А. Г. Бобылёв и др., *Биохимия* **82** (2), 280 (2017).
7. J. L. Steiner, and C. H. Lang, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **308**: E699 (2015).
8. C. Lipina, and H. S. Hundal., *J. Cachexia Sarcopenia Muscle* **8** (2), 190 (2017).
9. M. E. Woodworth-Hobbs, M. B. Hudson, J. A. Rahner, et al., *J. Nutr. Biochem.* **25** (8), 868 (2014).
10. Y. Liu, F. Chen, J. Odle, et al., *J. Nutr.* **143** (8), 1331 (2013).
11. C. J. Green, K. Macrae, S. Fogarty, et al., *Biochem J.* **435** (2), 463 (2011).
12. Z. Wang, J. Song, L. Zhang, et al., *Cell Stress Chaperones* **22** (2), 245 (2017).
13. J. Ren, *Novartis Found Symp.* **285**, 269, discussion 76–79, 198 (2007).
14. A. I. Cederbaum, Y. Lu, and D. Wu, *Arch. Toxicol.* **83** (6), 519 (2009).
15. S. Balbo and P. J. Brooks, *Adv. Exp. Med. Biol.* **815**, 71 (2015).
16. R. J. Dinis-Oliveira, *Curr. Drug Metab.* **17**, 327 (2016).
17. C. Hu, F. Ge, E. Hyodo, et al., *J. Mol. Cell Cardiol.* **59**, 30 (2013).
18. R. O. Salem, M. Laposata, R. Rajendram, et al., *Alcohol Alcohol.* **41** (6), 598 (2006).
19. M. E. Beckemeier and P. S. Bora, *J. Mol. Cell Cardiol.* **30** (11), 2487 (1998).
20. C. Heier, H. Xie, and R. Zimmermann, *IUBMB Life* **68** (12), 916 (2016).
21. A. Herms, M. Bosch, N. Ariotti, et al., *Curr. Biol.* **23** (15), 1489 (2013).
22. D. Sunnasy, S. R. Cairns, F. Martin, et al., *J. Clin. Pathol.* **36** (7), 778 (1983).
23. C. N. Lang, D. Wu, R. A. Frost, et al., *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **277**, E268 (1999).
24. C. S. Lieber and L. M. DeCarli, *Alcohol Alcohol.* **24**, 197 (1989).
25. D. R. Knapp, *Handbook of Analytical Derivatization Reactions* (John Wiley and Sons Inc., New York, 1979).
26. L. Dan and M. Laposata, *Alcohol Clin. Exp. Res.* **21** (2), 286 (1997).
27. A. A. Nanji, B. Griniuviene, S. M. Sadrzadeh, et al., *J. Lipid Res.* **36** (4), 736 (1995).
28. M. J. Ronis, S. Korourian, M. Zipperman, et al., *J. Nutr.* **134** (4), 904 (2004).
29. M. Park, A. Sabetski, Y. Kwan Chan, et al., *J. Cell Physiol.* **230** (3), 630 (2015).
30. M. Jové, A. Planavila, J. C. Laguna, et al., *Endocrinology* **146** (7), 3087 (2005).
31. M. Jové, A. Planavila, R. M. Sánchez, et al., *Endocrinology* **147** (1), 552 (2006).
32. A. Kadotani, Y. Tsuchiya, H. Hatakeyama, et al., *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **297** (6), E1291 (2009).
33. M. E. Woodworth-Hobbs, B. D. Perry, J. A. Rahner, et al., *Physiol. Rep.* **2017**; **5** (23), e13530 (2017).
34. L. Salvadó, T. Coll, A. M. Gómez-Foix, et al., *Diabetologia* **56**, 1372 (2013).

35. H. Lee, J. Y. Lim, and S. J. Choi, *Oxid. Med. Cell Longev.* 2017:2739721 (2017). DOI: 10.1155/2017/2739721.
36. A. Akoumi, T. Haffar, M. Moustherji, et al., *Exp. Cell Res.* **354** (2), 85 (2017).
37. C. P. Calder, *Biochem. Soc. Trans.* **45** (5), 1105 (2017).
38. P. C. Calder, *Biochim. Biophys. Acta* **1851** (4), 469 (2015).
39. G. Yin, Y. Wang, X. M. Cen, et al., *J. Immunol. Res.* 2017:3262384 (2017). DOI: 10.1155/2017/3262384.
40. Y. Zhang, M. Zhang, B. Lyu, et al., *Sci. Rep.* **7**, 36368 (2017). DOI: 10.1038/srep36368.
41. Y. Wada, S. Sakiyama, H. Sakai, and F. Sakane, *Lipids* **51** (8), 897 (2016). DOI: 10.1007/s11745-016-4162-9.
42. A. Ochi, T. Abe, R. Nakao, et al., *Arch. Biochem. Biophys.* **570**, 23 (2015). DOI: 10.1016/j.abb.2015.02.006.
43. Ю. В. Грицына, А. Д. Уланова, Н. Н. Салмов и др., *Молекуляр. биология* **53** (1), (2019) (принято к печати).
44. S. Tripathy and D. B. Jump, *J. Lipid Res.* **54** (1), 71 (2013).
45. A. Matoba, N. Matsuyama, S. Shibata, et al., *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* **314** (3), L333 (2018).
46. S. Sergeant, E. Rahbar, and F. H. Chilton, *Eur. J. Pharmacol.* **785**, 77 (2016).
47. X. Wang, H. Lin, and Y. Gu, *Lipids Health Dis.* **11**, 25 (2012).
48. J. Yeung, B. E. Tourdot, R. Adil, et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **36** (10), 2068 (2016).
49. J. L. Marques-Rocha, M. Garcia-Lacarte, M. Samblas, et al., *J. Physiol. Biochem.* (2018). DOI: 10.1007/s13105-018-0629-x.

Fatty Acid Levels in Striated Muscles of Chronic Alcohol-Fed Rats

T.P. Kulagina*, Yu.V. Gritsyna**, A.V. Aripovsky***,
V.K. Zhalimov*, and I.M. Vikhlyantsev** ****

**Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

***Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

****State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, 142279 Russia*

*****Pushchino State Institute of Natural Sciences, prosp. Nauki 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

Changes in the fatty acid levels in the cardiac and gastrocnemius muscles of rats chronically alcoholized for three and six months were studied using two methods of alcoholization: 30% ethanol-containing agar (method I) and 5% ethanol-containing liquid diet with balanced nutritial status (method II). In control group, the fatty acid level in the cardiac muscle was considerably higher than that in gastrocnemius muscle. In animals, that were alcoholized over a 3-month period using method I, a considerable increase in the levels of myristic, pentadecane, palmitic, stearic, dihomogamma-linolenic acids and the total amount of fatty acids and a decrease in ω -3 docosapentaenoic acid level were found in the cardiac muscle. After a 6-month period during which rats were alcoholized using method I, an increase in the levels of palmitoleic and ω -6 docosapentaenoic acids and a decrease in the levels of stearic, eicosadienoic, arachidonic acids were found. The amount of ω -3 docosapentaenoic acid in the myocardium, as compared to that observed after a 3-month period during which rats were alcoholized, remained reduced compared to control. In gastrocnemius muscle of rats alcoholized for three months using method I, the amount of myristic, vaccenic, dihomogamma-linolenic acids and ω -6 docosapentaenoic acid increased. Simultaneously, there was a tendency for the total amount of saturated, monounsaturated, ω -6 polyunsaturated fatty acids and total amount of fatty acids to rise. After a 6-month alcoholization, a decrease in the levels of myristic, oleic, linoleic, alpha- and gamma-linolenic and eicosadienoic acids, as well as total amount of saturated, ω -6 polyunsaturated fatty acids and total amount of all fatty acids was found. When animals were introduced to ethanol over a 3-month period using method II, a significant increase in the amount of dihomogamma-linolenic acid occurred in the cardiac and gastrocnemius muscles. The role of these changes in pathologies of the muscle is discussed.

Keywords: chronic alcohol-fed rats, fatty acids, striated muscles