

Свободные жирные кислоты – фактор риска инсулинорезистентности и ишемии: перспективы для оценки рисков и диагностики

Вельков В.В.,

ЗАО «ДИАКОН», 142290, г. Пущино, Московская область, Пр. Науки 5. Россия.

Обзор научной литературы, посвященный анализу последних достижений в области применения измерения концентраций свободных жирных кислот (СЖК) в плазме крови для оценки рисков и диагностики метаболического синдрома (МС), инсулинорезистентности (ИР), сахарного диабета 2 типа, ишемической болезни сердца (ИБС) и для мониторинга эффективности терапии указанных патологий. Особое внимание уделено рассмотрению механизмов, приводящих к *липотоксичности* высоких уровней СЖК для бета-клеток поджелудочной железы и *кардиотоксичности* для миокарда. Достаточно подробно рассматриваются механизмы, за счет которых повышенные плазменные уровни СЖК, вызванные избыточным весом, приводят к ИР, ИБС и диабетической кардиомиопатии.

Ключевые слова: свободные жирные кислоты, не этерифицированные жирные кислоты, адипозные клетки, ожирение, метаболический синдром, инсулинорезистентность, сахарный диабет 2 типа, дислипидемия, атерогенез, ишемия, диабетическая кардиомиопатия.

Содержание

Ожирение – чума XXI века, связанная с низким социально-экономическим статусом

Метаболизм СЖК: синтез и окисление

СЖК - основной метаболический ресурс для миокарда

Белки, связывающие СЖК: транспорт СЖК в миокарде

Избыточный жир – избыточный липолиз – избыточные уровни СЖК в крови

К чему ведут повышенные уровни СЖК: от ИР к ИБС

Липотоксичность избытка СЖК: сначала для адипозных тканей, «далее – везде».

Хронически высокие уровни СЖК оказывают липотоксический эффект

на бета-клетки поджелудочной железы.

Уровни СЖК – «вопрос жизни и смерти» для бета – клеток

Повышенные уровни СЖК приводят к повышенному эндогенному синтезу глюкозы

СЖК – независимый предиктор нарушения толерантности к глюкозе и СД 2

Патологический метаболизм избытка СЖК в скелетных мышцах.

Повышенные уровни церамида нарушают путь передачи инсулинового сигнала

и приводят к ИР

Диацилглицерин, триацилглицерин и триглицериды в скелетных мышцах при ИР

Триглицериды в скелетных мышцах при ИР

Избыточные количества адипоцитокинов,

секретируемые избыточными количествами жировых тканей,

нарушают гомеостаз глюкозы

ИР, вызванная высоким уровнем СЖК, еще больше повышает уровень СЖК

Повышенные уровни СЖК нарушают метаболизм холестерина

и приводят к атерогенезу.

Повышенные уровни СЖК вызывают оксидативный стресс

Ишемия, вызванная высоким уровнем СЖК, еще больше повышает уровень СЖК

Повышенные уровни СЖК и дисфункция левого желудочка

Повышенные СЖК – самый ранний маркер ишемии

Повышенные уровни СЖК предсказывают внезапную смерть

Приводят ли повышенные уровни СЖК к повышению тромбогенеза?

Повышенные уровни СЖК – цель для терапии

Порочный круг повышения уровней СЖК

Методы определения СЖК

Практические рекомендации

Литература

В зарубежной медицинской литературе свободные жирные кислоты (СЖК) иногда называют «красной лампочкой на приборной доске миокарда». Действительно, повышение их плазменных уровней сигнализирует о все возрастающей опасности. Сначала о метаболическом синдроме (МС), потом об инсулинорезистентности (ИР), потом о диабетической кардиомиопатии, а когда эта «лампочка» загорается уже совсем ярко, об ишемической болезни сердца (ИБС). А дальше эта лампочка может перегореть и вспыхнут «лампочки» маркеров некроза миокарда. И довольно часто, маркеры некроза свидетельствуют о том, что «точка не возврата» уже пройдена, что последствия ишемии уже практически необратимы. А ведь повышенные уровни СЖК начинают «светиться красным», задолго до этой точки. Когда время изменить курс еще есть.

Разумеется, повышенные уровни СЖК самым прямым образом связаны с ожирением.

Ожирение – чума XXI века, связанная с низким социально-экономическим статусом.

Ожирение – одна из главных причин, предрасполагающих к развитию МС, ИР и приводящих к пандемическому распространению сахарного диабета 2 типа (СД 2) и, как итог, к сердечно-сосудистым заболеваниям (ССЗ). МС иногда даже называют «чумой XXI века». В США, например, МС присутствует у 22,8% мужчин и у 22,6% женщин. При этом он диагностируется у 4,6% лиц с нормальным весом, у 22,4% лиц с избыточным весом и у 59,6% лиц, страдающих ожирением (1). Можно было бы предположить, что МС развивается у людей со сравнительно высоким экономическим статусом, который позволяет избыточное потребление пищи. В действительности же в США при широкомасштабном исследовании (обследовано 4978 мужчин и 2035 женщин, возрастом от 39 до 63 лет) была обнаружена обратная зависимость между положением человека на социально-экономической лестнице и вероятностью наличия МС. И был сделан вывод, что «развитие МС – это биологический механизм, который приводит к «социальному неравенству» в распределении коронарного риска среди людей». Как известно, у лиц с высоким социально-экономическим статусом такой риск, согласно статистике, значительно ниже (2,3).

Похоже, что именно детство, проведенное в бедности, уже в зрелые годы приводит к ожирению. Это было установлено, когда исследовались 4774 мужчины и 2206 женщин, родившиеся в 1930 - 1953 гг. Оказалось, высокие коронарные риски (повышенные уровни триглицеридов и низкие уровни Х-ЛПВП) более связаны с низким социо-экономическим статусом, который имел место во взрослом возрасте, чем с «бедным детством». Тем не менее, именно у тех лиц, отцы которых принадлежали к более низким социальным классам, во взрослом возрасте преимущественно наблюдался избыточный вес. Полагается, что «низкий социо-экономический статус начинает повышать коронарные риски начиная с детства и резко возрастает при его снижении в зрелом возрасте» (4).

Более того, весьма похоже, что приводят к СД 1 и СД 2 могут также и психологические стрессы. Так, при СД 1 и СД 2 высокие уровни СЖК связаны и повышенным образованием в митохондриях активных форм кислорода, которые, в свою очередь, активирует различные внутриклеточные реакции, что нарушает нормальные пути прохождения регуляторных сигналов (например, за счет нарушения активности т.н., «стресс-чувствительных киназ»). Это ведет к снижению способности клеток адекватно реагировать на действие инсулина. Таким образом, оксидативный стресс, являющийся результатом активации системы неспецифического иммунитета, как полагается, является одним из казуативных факторов развития ИР (5). Активировать системы неспецифического иммунитета, как обнаружилось, могут весьма многочисленные и разнообразные факторы, экзогенные, эндогенные, социально-экономические, психологические (6).

Метаболизм СЖК: синтез и окисление.

Свободные (или не этерифицированные) жирные кислоты образуются в результате гидролиза триглицеридов, содержащихся в адипозных тканях. В общем, плазменные жирные кислоты, или этерифицированы и большей частью связаны с альбумином или не этерифицированы и находятся в плазме в свободном состоянии. В плазме СЖК обнаруживаются в диапазоне концентраций от 100 микромоль/л – до 1 ммоль/л (100 $\mu\text{mol/L}$ –1 mmol/L) и их уровень сильно зависит от времени суток. После каждого дневного приема пищи уровень СЖК в плазме падает, так как в норме инсулин подавляет липолиз адипозных клеток, в результате которого и образуются СЖК. В ночное время концентрация СЖК в плазме возрастает. К этим нормальным суточным колебаниям уровней СЖК «подстраиваются» почти все другие ткани, в частности, скелетные мышцы, которые «переключаются» с утилизации глюкозы (днем) на потребление СЖК (ночью).

Способность скелетных мышц (и других тканей) подстраивать свой метаболизм к доминирующему в данный момент субстрату принято называть хорошим «метаболическим здоровьем» или «метаболической гибкостью». Понятно, что хорошее «метаболическое здоровье» связано с нормальной чувствительностью к инсулину (7).

Но есть одна ткань, которая «работает» на СЖК и днем и ночью.

СЖК - основной метаболический ресурс для миокарда

В миокарде СЖК быстро метаболизируются за счет бета - окисления в митохондриях и обеспечивают сердцу от 65 до 70% АТФ. Остальные 20-25% АТФ миокард получает за счет гликолиза. Несмотря на то, что именно СЖК – самое предпочтительное «топливо» для сердца – его «сжигание» весьма затратный процесс - окисление 1 моля СЖК требует большего количества кислорода, чем окисление 1 моля глюкозы. И хотя в норме эти потребности в кислороде удовлетворяются, при его дефиците (ишемия), окисление СЖК падает, их уровень в плазме возрастает, что ведет к самым серьезным патологическим последствиям (8,9).

Белки, связывающие СЖК: транспорт СЖК в миокарде.

Поглощение СЖК миоцитами происходит как за счет пассивной диффузии, так и путем активного транспорта, который осуществляет особый переносчик, т.н., белок сердечного типа, связывающий СЖК (heart type fatty acids binding protein – H-FABP), связанный с плазматической мембраной миоцитов. Еще один ключевой белок транспорта СЖК в миокарде - транслоказа жирных кислот (fatty acid translocase, FAT; другое ее название - CD36). Эти белки обеспечивают транспорт СЖК во внешнюю мембрану митохондрий, где СЖК этерифицируются / активируются за счет длинноцепочечной ацетил КоА синтетазы (long-chain acyl-CoA synthetase). Образовавшиеся эфиры жирных кислот направляются на бета-окисление, часть их может поступать на запасание в виде триглицеридов или входить в состав фосфолипидов мембран. При повышении потребности в энергии, активность этих белков переносчиков СЖК повышается (10). При ишемии и некрозе миокарда H-FABP быстро высвобождается в кровоток и является ранним и чувствительным маркером инфаркта миокарда (ИМ) (11).

Применение диагностического теста с использованием H-FABP способствует раннему выявлению пациентов с плохим прогнозом при развитии острого коронарного синдрома (ОКС), не имеющего признаков повреждения миокарда, который диагностируется согласно тропониновому тесту. Так, в проспективном исследовании с участием 1448 пациентов, поступивших с ОКС, показано, что H-FABP являлся значимым предиктором исходов, с повышением относительного риска смерти в течение 1 года в от наименьшей к наибольшей квартили этого показателя. В целом смертность в течение 1 года от всех причин у пациентов с нестабильной стенокардией и уровнями H-FABP ниже 5,8 мг/л составила 2,1% по сравнению с 22,9% у пациентов с более высокими уровнями H-FABP. В данный момент стоимость одного иммунохроматографического экспресс-теста на H-FABP составляет 10 фунтов стерлингов (470 руб. по курсу на 30.05.08), и он может использоваться в машинах скорой помощи. Полагается, что данный тест может эффективно дополнять тесты на миоглобин, тропонин I и на креатинкиназу MB (12).

Избыточный жир → избыточный липолиз → избыточный уровень СЖК в крови.

Адипозные клетки традиционно рассматривались как орган для хранения избыточных энергетических ресурсов, запасаемых в виде триглицеридов и расходуемых, (при снижении поступления энергии), в виде СЖК, которые образуются из запасенных триглицеридов путем гидролиза. При этом молчаливо предполагалось, что СЖК - это только важный метаболический ресурс, а адипозные клетки – только хранилище триглицеридов. Многочисленные исследования последних лет показали, что, во-первых, СЖК – это не только высокоэнергетическое топливо, но и важные сигнальные молекулы. Их концентрация – важный регуляторный фактор, влияющий на интенсивность утилизации глюкозы в мышцах. И, второе, адипозные ткани – это еще и важнейший эндокринный орган, который секретирует большое количество факторов, названных адипоцитокинами, которые имеют или сенсibiliзирующее влияние на инсулин (это адипонектин и лептин), или действие, стимулирующее ИР, в частности, фактора некроза опухолей – альфа (ФНО-альфа), резистин и др. (13).

При избыточном количестве адипозных тканей происходит их избыточный липолиз. В норме высвобождение СЖК из адипозных тканей строго регулируется, что обеспечивает другие ткани четко сбалансированным количеством СЖК, необходимым для адекватного удовлетворения

их энергетических нужд. Но при ожирении в кровотоке поступают, таким образом, патологически повышенные количества сигнальных молекул (в особенности, ФНО-альфа), что ведет к нарушению метаболического гомеостаза (14,15).

Таким образом, самые ранние события, приводящие к нарушению механизма действия инсулина и возникновение ИР, происходят именно в адипозных клетках и задолго до возникновения нарушенной толерантности к глюкозе. Именно адипозные ткани в данный момент рассматриваются как место первоначального возникновения и развития ИР. Это происходит из-за: а) поступления в кровоток повышенных уровней СЖК и, 2) повышенной секреции адипоцитокинов.

К чему ведут повышенные уровни СЖК: от ИР к ИБС.

Резкое экспериментальное повышение уровня СЖК в плазме не только стимулирующим образом воздействует на бета-клетки и, тем самым, значительно повышает уровни инсулина (16) но и, как обнаружилось позднее, снижает скорость утилизации инсулина, что в итоге, дополнительно повышает его концентрацию (17).

Хроническое повышение концентрации СЖК в плазме. Большинство людей с ожирением имеют высокие уровни СЖК и ИР (18). Большинство, но не все. Действительно, в широкомасштабном исследовании показано, что только 17,1% лиц с избыточным весом (возрастом от 45 до 74 лет) имели нарушенную толерантность к глюкозе, только 11,9% - нарушенные уровни глюкозы натощак, только у 22,6% наблюдалось преддиабетическое состояние, и только 5,6 % имели одновременно и нарушенную толерантность к глюкозе и нарушенные уровни глюкозы натощак (19). Причина, почему не все лица с ИР заболевают СД в том, что повышенные уровни СЖК стимулируют секрецию инсулина, а это может в какой-то мере компенсировать пониженную чувствительность клеток к инсулину (20,21).

В целом, у здоровых индивидов, хроническое повышение плазменных уровней СЖК, происходящее в физиологическом диапазоне концентраций, повышает секрецию инсулина. Полагается, что у лиц с избыточным весом, имеющих нормальную толерантность к глюкозе (и не имеющих генетической предрасположенности к СД), ИР, вызванная повышенными уровнями СЖК, полностью компенсируется повышенной секрецией инсулина, вызванной высокими уровнями СЖК. У таких лиц развивается гиперинсулинемия, но не гипергликемия. Это и объясняет, почему у более, чем половины лиц с ожирением и с повышенными плазменными СЖК СД не развивается (18).

Однако при уровнях СЖК, превышающих их физиологический диапазон, картина совершенно иная. Повышение скорости окисления СЖК ведет к повышению потребления миокардом O₂ и к накоплению внутриклеточных интермедиатов, что ведет к патологическим последствиям (22). Эти последствия, о которых более подробно будет сказано ниже, включают в себя нарушения в работе АТФ зависимого ионного насоса и мобилизацию внутриклеточного катионов кальция, что ведет к перегрузке миокарда кальцием и к нарушениям его релаксации (23), в результате которых возникает диабетическая кардиомиопатия (24), или дилатационная липотоксическая кардиомиопатия (dilated lipotoxic cardiomyopathy), так как при избыточных количествах СЖК в плазме липиды в миокарде «из источника энергии превращаются в источник токсинов» (25).

Повышение скорости окисления СЖК ведет к нарушению окисления глюкозы. Что, в свою очередь, ведет к накоплению лактата, а это еще больше стимулирует окисление СЖК (26).

Липотоксичность избытка СЖК: сначала для адипозных тканей, «далее – везде».

У лиц с СД 2 адипозные клетки имеют тенденцию к увеличению размеров. Такие увеличенные клетки устойчивы к антилиполитическому действию инсулина, что ведет: а) к повышению уровня СЖК на протяжении всего дня и, б) к снижению способности хранить триглицериды. В результате, липиды, более «не удерживаемые» адипозными тканями выходят в кровоток и «переполняют» мышцы, печень, почки и бета-клетки поджелудочной железы. Более того, дисфункциональные адипозные клетки начинают секретировать избыточные количества факторов, провоцирующих развитие: а) ИР, б) воспалительных процессов в стенках сосудов, 3) атеросклероза. При этом адипозные клетки теряют способность секретировать необходимые нормальные количества инсулин-сенсibiliзирующих цитокинов (27).

Хронически высокие уровни СЖК оказывают липотоксический эффект на бета-клетки поджелудочной железы.

Действительно, хронически повышенные уровни СЖК оказывают токсическое действие на бета-клетки поджелудочной железы. Это явление было названо «липотоксическим эффектом» (28). Как уже говорилось, острое воздействие высоких концентраций глюкозы и СЖК на бета-клетки сильно повышает высвобождение инсулина. Но хроническое воздействие высоких уровней СЖК – ведет к десенсibilизации бета-клеток и к подавлению секреции инсулина. В целом, изменение уровней СЖК – один из важнейших механизмов регуляции функции бета-клеток. Нормальное переключение от синтеза СЖК к их окислению критический момент для нормального функционирования бета-клеток. Молекулярные механизмы, за счет которых повышенный уровень СЖК влияет: 1) на проводимость ионных каналов в мембранах бета-клеток, 2) на ацетилирование их сигнальных белков, 3) на их апоптоз и, 4) на экспрессию генов в бета-клетках, интенсивно изучаются (29-31).

Уровни СЖК – «вопрос жизни и смерти» для бета – клеток.

Хронически повышенные уровни СЖК могут оказывать на бета-клетки не только подавляющее, но и губительное воздействие, сначала приводить к десенсibilизации и к подавлению секреции инсулина, а потом – к апоптозу. (Апоптоз – генетически запрограммированный процесс гибели клеток, который может включаться различными стимулами). Таким образом, изменения уровней СЖК – весьма важны не только для регулирования функций бета – клеток, но и для решения вопроса «жить или умирать» (32). Повышенные концентрации СЖК приводят к апоптозу бета-клеток и, как следствие, к СД 2, из-за того, что высокие уровни СЖК вызывают стресс в эндоплазматическом ретикулуме. Это показано в экспериментах *in vitro* с использованием первичной культуры бета-клеток, которые подвергали воздействию высоких концентраций олеата и пальмитата. При этом не метаболизируемые аналоги этих жирных кислот апоптоза бета-клеток не вызывали (33).

Однако липотоксичность затрагивает не только бета-клетки. Избыток СЖК сопровождается накоплением триглицеридов в паренхимальных клетках многих тканей, а именно. в скелетных и кардиальных миоцитах и в гепатоцитах, что ведет к их повреждению и хронической дисфункции. В почках инфильтрация СЖК утяжеляет повреждения канальцев и воспалительный процесс, развивающиеся при состояниях, связанных с протеинурией, что ведет к прогрессированию нефропатии (34).

Повышенные уровни СЖК приводят к повышенному эндогенному синтезу глюкозы

Повышенный поток СЖК в печень за счет липолиза висцерального жира ведет к повышению эндогенного синтеза глюкозы в печени, что усиливает гипергликемию (35). Полагается твердо установленным, что «*глюколипотоксичность*» избытка СЖК вызывает стресс эндоплазматического ретикулума, ведущий к ИР и, опять же, к гибели бета-клеток. Молекулярные механизмы этих процессов выясняются (36).

В целом, многократно и достоверно показано, что «*глюколипотоксичность*» избытка СЖК у большинство пациентов, страдающих ожирением, приводит к цепи патологических нарушений гомеостаза глюкозы и к ИР многих тканей, (мышечных, печени, адипозных, эндотелиальных клеток) (10, 18, 37-39). Все это имеет важное значение для практики клинической лабораторной диагностики.

СЖК – независимый предиктор нарушения толерантности к глюкозе и СД 2.

Итак, повышенный поток СЖК из большой массы адипозных клеток, а также нарушения в механизмах, хранения триглицеридов и в механизмах липолиза в тканях, исходно нормально чувствительных к инсулину – это, похоже, самые ранние проявления аномалий, приводящих к ИР. Принципиально, что эти нарушения обнаруживаются еще **до** развития постпрандиальной гипергликемии или до развития гипергликемии натощак. Действительно, повышение натощак плазменных уровней СЖК, пожалуй, самое раннее указание на будущее нарушение толерантности к глюкозе. В проспективном исследовании ежегодно (в течение 4, 0 +/- 2,4 лет) наблюдали 190 индейцев племени Пима, исходно не страдавших СД. В конце исследования у 47 человек развился СД 2. Показано, что повышенные уровни СЖК натощак – это фактор риска СД 2, независимый ни от пола, ни от процента жира, ни от его расположения в теле (40).

В более позднем исследовании, включавшем наблюдение 3671 индивида с нормальной толерантностью к глюкозе и 418 лиц с нарушенной толерантностью к глюкозе, обнаружилось, что высокие уровни СЖК натошак у лиц с исходно нормальной толерантностью к глюкозе были предикторами нарушенной толерантности к глюкозе. И, что важно, независимыми ни от ИР, ни от нарушений секреции глюкозы (41).

В последующем большом проспективном исследовании 9 лет наблюдали 580 лиц с СД и 556 лиц без СД. Уровни СЖК были обратно пропорционально связаны длиной роста, прямо пропорционально связаны с женским полом, индексом массы тела, с объемом талии, с показателями соотношения «окружность талии к окружности бедер», с частотой пульса, с уровнями триглицеридов в плазме, и с показателями воспаления (определявшимся по 6 маркерам воспаления). Был сделан вывод, что «... повышенные натошак уровни СЖК – фактор риска СД 2» (42).

Но за счет каких механизмов повышенные уровни СЖК приводят к нарушенной толерантности к глюкозе вызывают ИР? Таких механизмов, по крайней мере, два. И связаны они с тем, какие именно вещества в повышенных концентрациях секретируют в кровь избыточные количества жира. СЖК или адипоцитокينات. Как правило, и те и другие одновременно. Сначала рассмотрим, к чему приводят повышенные уровни СЖК. В тканях они вызывают ИР, а в стенках сосудов – оксидативный стресс, ведущий к атерогенезу.

Патологический метаболизм избытка СЖК в скелетных мышцах.

Накопление СЖК в не адипозных тканях, (в первую очередь, в скелетных мышцах и в печени), т.е., в тканях не предназначенных для нормального хранения жировых запасов и не имеющих для этого специальных биохимических механизмов, приводит к их аномальному метаболизму. В результате, в местах неправильного хранения СЖК накапливаются интермедиаты метаболизма жиров, такие как церамиды, диацилглицерол и триглицериды, что приводит к нарушению пути передачи инсулинового сигнала и, тем самым, транспорта глюкозы.

В частности, образовавшиеся при избытке СЖК в скелетных мышцах повышенные уровни церамида «ошибочно» активируют регуляторный каскад сериновых киназ, что нарушает путь передачи инсулинового сигнала (43-45).

Церамид (N-ацилсфингозин) – это интермедиат биосинтеза сфингомиелина, который образуется при взаимодействии сфингозина с ацил-КоА. Ацильная группа чаще всего представлена длинноцепочечной насыщенной или моноеновой кислотой. Церамид состоит из двух частей: сфингоидного основания (главным образом, сфингозина) и жирно-кислотного остатка, соединенных амидной связью. Церамид – важный липидный компонент клеточной мембраны. Вторая важнейшая роль церамида – он вторичный мессенджер в сигнальном пути *сфингомиелина* и участвует в регуляции таких клеточных процессов как клеточная дифференцировка, клеточная пролиферация и апоптоз.

Сфинголипиды, как известно, являются обязательным компонентом всех эукариотических клеток, они различаются между собой химическим строением и биологическими функциями, но объединены общей основой – сфингоидным основанием. Они - предшественники активных метаболитов, играющих существенную роль в развитии ткани, онкогенезе, росте и дифференциации клеток. Критическая роль в регуляции клеточных процессов через сигнальный сфингомиелиновый путь принадлежит именно церамиду, который, являясь вторичным мессенджером, ингибирует протеинкиназу С. обладает антипролиферативным действием, модулирует фосфорилирование различных белков, влияет на активность фосфолипазы А2 и является потенциальным индуктором апоптоза. Синтез церамида зависит от доступности СЖК, которые участвуют в начальной лимитирующей скорости реакции, включающий конденсацию пальмитоил- КоА и серина, катализируемой серин-пальмитоил-трансферазой (serine palmitoyltransferase - SPT) ведущей к образованию 3-оксисфинганина (3-oxosphinganine). Последующие реакции приводят к последовательному синтезу сфинганина, дигидроцерамида, и церамида. Последний является предшественником наиболее активных сфинголипидов. Синтез церамида завершается с помощью дигидроцерамиддесатуразы (dihydroceramide desaturase - DES1). Повышенные уровни церамида, образовавшиеся из-за избыточных количеств СЖК, ФНО-альфа или глюкокортикоидов, нарушают передачу инсулинового сигнала путем ингибирования фосфорилирования в системе Akt/PKB. Что блокируют транслокацию Akt/PKB из цитоплазмы в плазматическую мембрану (46).

Повышенные уровни церамида нарушают путь передачи инсулинового сигнала и приводят к ИР.

Действительно, у лиц с ожирением и страдающих ИР, уровни церамида в скелетных мышцах повышены в 2 раза и это повышение связано с повышенными концентрациями СЖК в плазме и с понижением интенсивности фосфорилирования протеинкиназы Akt (47). Поскольку церамид, как указывалось, вторичный мессенджер сфингомиелинового сигнального пути, представляло значительный интерес выяснить, действительно ли параметры этого регуляторного пути нарушены в скелетных мышцах у лиц, имеющих риск развития СД 2. Наблюдали 12 тощих лиц, не имевших случаев СД в семейной истории и 21 пациента, страдающих избыточным весом или ожирением, из которых 12 имели нормальную толерантность к глюкозе и 9 – нарушенную. После биопсии мышцы *vastus lateralis* в препаратах определялись уровни церамида, сфингомиелина, сфинганина и сфингозина, активности сфингомиелиназы и церамидазы, а также уровни диацилглицерола и триацилглицерола. Оказалось, что по сравнению с контрольной группой тощие потомки диабетиков и мужчины с ожирением имели: а) сниженную чувствительность к инсулину и, б) повышенные уровни церамида. В целом, лица с ожирением и с нарушенной толерантностью к глюкозе имели: а) низкую чувствительность к инсулину и, б) высокие уровни церамидов (по сравнению с лицами, имевшими ожирение и нормальную толерантность к глюкозе). У потомков диабетиков уровни церамидазы (расщепляет церамид) были снижены. Принципиально, что повышенные уровни церамида были связаны со сниженной чувствительностью к инсулину независимо от уровней других измерявшихся липидов. Авторы делают вывод, что «церамид накапливается в мышцах мужчин, имеющих риск развития СД 2» (48).

Для прямого доказательства того, что именно повышенные уровни церамида приводят к нарушению гомеостаза глюкозы были проведены опыты с животными и фармакологическими агентами, которые показали, что снижение уровней церамида (за счет ингибирования его синтеза) действительно улучшает гомеостаз глюкозы у инсулинорезистентных трансгенных мышей, имевших ожирение и СД (49). Положение о том, что повышенные уровни церамида индуцируют ИР было подтверждено и опытах *in vitro* на первичной культуре миоцитов человека (50). Весьма существенно, что повышенные уровни церамида токсичны для многих типов клеток, в особенности для бета-клеток, кардиоцитов и др. (51).

Диацилглицерин, триацилглицерин и триглицериды в скелетных мышцах при ИР.

Еще один «виновник» ИР – диацилглицерин - ДАГ (diacylglycerol – DAG). Его повышенные уровни, так же, как и высокие уровни СЖК, связаны со степенью тяжести СД 2 и он так же нарушает сигнальный путь инсулина. В этом случае передача инсулинового сигнала ингибируется за счет фосфорилирования на уровне инсулинового рецептора и субстрата рецептора инсулина (IRS-1). Это фосфорилирование осуществляется протеинкиназой С. Высокие уровни ДАГ, как показано, связаны с активацией протеинкиназы С и с понижением фосфорилирования киназы P13, осуществляемого белком субстратом рецептора инсулина IRS-1. Полагается, что синтез церамида и ДАГ – это потенциальные мишени для новых терапевтических препаратов, предназначенных для лечения ИР (52). Также показано, что при ожирении и СД 2 поток СЖК в скелетные мышцы (по сравнению с контролем) повышен в 4 раза и связан избыточным накоплением в мышцах триацилглицерина (53).

Триглицериды в скелетных мышцах при ИР.

Еще одна характерная для ИР метаболическая патология – накопление вокруг мышечных фибрилл триглицеридов (54). Однако накопление триглицеридов внутри скелетных мышц, как полагается, не является непосредственной причиной развития СД 2, но, похоже, может быть маркером интермедиатов липидов, таких, как ацетил КоА, церамиды и диацилглицерин (55-57).

Таким образом, первый механизм развития ИР при избыточных концентрациях СЖК, происходит реализуются за счет того, что:

- повышаются уровни глюкозы, хронически высокие уровни СЖК оказывают «липотоксический токсический» эффект на бета-клетки поджелудочной железы,
- образовавшаяся гипергликемия усугубляется тем, чем повышенный поток СЖК в печень, в особенности, за счет липолиза висцерального жира, повышает в печени эндогенный синтез глюкозы.
- повышенные уровни церамидов, диацилтриглицерила и триацилглицерина ингибирует путь передачи инсулинового сигнала в скелетных мышцах.

Избыточные количества адипоцитокинов, секретируемые избыточными количествами жировых тканей, нарушают гомеостаз глюкозы.

Действительно, большая масса адипоцитов синтезирует повышенные количества провоспалительных цитокинов, что приводит к хроническому воспалительному процессу, который, а) нарушает путь передачи инсулинового сигнала и, б) повреждает функции митохондрий, что нарушает гомеостаз глюкозы. В частности, секретируемые жировыми клетками ИЛ-6 и ФНО-альфа утяжеляют ИР, а секретируемый ангиотензин II повышает артериальное давление и способствует развитию атеросклероза. В целом, цитокины, выходящие из адипоцитов или из макрофагов (инфильтрующих адипозные ткани) становятся антагонистами действию инсулина (18, 35,58).

ИР, вызванная высоким уровнем СЖК, еще больше повышает уровень СЖК.

Как известно, инсулин – это гормон плеiotропного действия, основная функция которого стимулировать потребление глюкозы скелетными мышцами и миокардом, подавлять в печени синтез глюкозы и Х-ЛПОНП. Еще одна важная функция инсулина – подавление секреции СЖК адипозными тканями (59). При ИР эта функция инсулина нарушается. Как обнаружилось, инсулинорезистентные адипозные клетки секретируют повышенные уровни СЖК, что, собственно и позволяет считать повышенные уровни СЖК маркером ИР. Действительно, при ИР уровень СЖК в гепатоцитах повышается, т.к., в них: 1) повышается липогенез *de novo*, 2) этерификация СЖК превышает их окисление, 3) этерифицированные жирные кислоты запасаются в виде триглицеридов или направляются на синтез Х-ЛПОНП (богатых триглицеридами) 4) понижается регулируемая инсулином мобилизация триглицеридов. В итоге, инсулинорезистентные жировые клетки интенсивно расщепляют содержащиеся в них триглицериды и высвобождают образовавшиеся из них СЖК в кровоток (как при ожирении, так и без него). Поток СЖК из адипозных клеток повышается и, более того, СЖК выходят из Х-ЛПОНП и из хиломикронов плазмы и по кровотоку частично направляются в другие органы, а частично – обратно в печень, где снова превращаются в триглицериды. Происходит «накачка» печени СЖК и триглицеридами. Это имеет самые тяжкие последствия (9,18,60).

Повышенные уровни СЖК нарушают метаболизм холестерина и приводят к атерогенезу.

Вот как это происходит:

1) При высоких уровнях триглицеридов в печени из нее в плазму секретируются большие количества Х-ЛПОН.

2) В плазме из-за липолиза из Х-ЛПОНП образуются СЖК и высокоатерогенные ремнантные частицы липопротеинов, богатые триглицеридами.

3) Из плазмы СЖК и ремнантные частицы, снова поглощаются печенью, что еще больше повышает уровень СЖК в гепатоцитах и еще больше стимулирует синтез Х-ЛПОНП.

4) В печени, при высоком уровне Х-ЛПОНП и нормальном уровне белка-переносчика эфира холестерина (cholesteryl ester transfer protein - CETP)

а) триглицериды из Х-ЛПОНП переходят в Х-ЛПВП, а

б) холестерин из Х-ЛПВП переходит в Х-ЛПОНП. В итоге образуются: богатые холестерином очень атерогенные ремнантные частицы Х-ЛПОНП и Х-ЛПВП, содержащий много триглицеридов и мало холестерина.

5) Такие частицы Х-ЛПВП теряют и аполипопротеин Апо А1 триглицериды (из активности гепатитной липазы. В итоге *уровень антиатерогенного Х-ЛПВП понижается.*

6) При высоком уровне Х-ЛПОНП (богатых триглицеридами), белок CETP

а) переносит триглицериды из Х-ЛПОНП в Х-ЛПВП, и

б) переносит холестерин из Х-ЛПВП в Х-ЛПОНП.

7) Богатые триглицеридами Х-ЛПВП из-за активности гепатитной или липопротеиновой липазы теряют триглицериды, уменьшаются в размерах и становятся *очень атерогенными мелкими плотными частицами Х-ЛПВП* (61-63).

Таким образом, **повышенные уровни СЖК приводят к снижению уровня «антиатерогенного» Х-ЛПВП и к образованию крайне атерогенных мелких плотных частиц Х-ЛПВП, к повышению плазменных уровней триглицеридов.**

Но есть еще один путь, которым высокие уровни СЖК индуцируют атерогенез.

Повышенные уровни СЖК вызывают оксидативный стресс.

Повышенный уровень СЖК вызывает в митохондриях макрососудистых эндотелиальных клеток сверхсинтез активных форм кислорода, что ведет к окислению X-ЛПНП и к модификации X-ЛПВП, это индуцирует воспалительный процесс в стенках сосудов, эндотелиальную дисфункцию и приводит к образованию и накоплению холестеринаных бляшек, а затем - к ишемии (64-69). Ишемия еще больше ухудшает и без того тяжелую патологическую ситуацию.

Ишемия, вызванная высоким уровнем СЖК. еще больше повышает уровень СЖК.

Как говорилось, в миокарде СЖК за счет бета - окисления в митохондриях быстро метаболизируются и дают 65-70% АТФ, гликолиз дает 20-25% АТФ. Однако окисление 1 моля СЖК требует большего количества O₂, чем окисление 1 моля глюкозы. При ишемии и. тем более/ в анаэробных условиях, окисление СЖК резко падает и энергообеспечение сердца начинает зависеть преимущественно от гликолиза. Самое первое последствие ишемии – повреждение метаболизма в митохондриях, что снижает образование АТФ и приводит к накоплению лактата в клетках миокарда. Повышение при ишемии концентрации СЖК из-за их «неполного сгорания», еще больше утяжеляет патологическую ситуацию, которая сопровождается: а) повышением потребности в кислороде, б) нарушением гомеостаза кальция, в) уменьшением сокращения сердца; при этом также, г) подавляется окисление глюкозы за счет ингибирования пируватдегидрогеназы, что еще больше утяжеляет дефицит кислорода, вызываемый повышенными уровнями СЖК (9, 70,71).

Так, в пост-ишемических условиях и при реперфузии (during post-ischaemia and reperfusion (post-I/R), происходит резкое повышение уровней арахидоновой, пальмитиновой, олеиновой и линоленовой кислоты. Как показано в модельных опытах на крысах, повышенные уровни СЖК повышают неизбирательную проводимость мембран миоцитов и повышают в них приток катионов натрия и кальция, что ведет к перегрузке митохондрий этими катионами. Это активирует ферменты апоптоза (каспазу – 3). В целом, СЖК, накапливающиеся в миокарде в пост-ишемических условиях и при реперфузии, действуют как эндогенные ионофоры, что приводит к гибели миоцитов (72). Напомним, что ионофоры - это небольшие гидрофобные молекулы, которые растворяются в липидных бислоях и повышают их ионную проницаемость.

Таким образом, в ишемических и кардиомиопатических условиях:

- 1) утилизация глюкозы преобладает над использованием СЖК,
- 2) из-за этого плазменные уровни СЖК повышаются, при этом
- 3) при ишемии метаболизм СЖК становится патологическим, внутри ишемических клеток образуются лактат и ионы водорода, что ведет
 - а) к деградации контрактильности миокарда,
 - б) диастолической дисфункции и,
 - в) к снижению аритмогенного порога кардиомиоцитов (9,73).

Повышенные уровни СЖК и дисфункция левого желудочка

Ожирение связано с нарушениями сократительной функции миокарда (abnormalities in cardiac contractile function). Для выявления механизмов этой патологии изучалась связь между уровнями СЖК, инсулин-чувствительностью и функциями левого желудочка (ЛЖ) у 64 пациентов с клинически тяжелым ожирением (индекс массы тела в кг/м² > 35) . 38% пациентов имели СД, 53% - гипертензию, 90% – ИР, уровни СЖК были повышены у всех пациентов. Связи между чувствительностью к инсулину, антропометрическими показателями и контрактильными функциями ЛЖ обнаружено не было. Однако повышенные концентрации СЖК были независимо от других параметров связаны с нарушениями диастолической функции (74).

Более того, пациенты с признаками и симптомами сердечной недостаточности (СН) и с сохраненной систолической функцией ЛЖ, как показано, могут иметь значительные аномалии диастолической функции. Такое состояние называется диастолической сердечной недостаточностью ДСН (diastolic heart failure - DHF) и наблюдается оно у 40% больных с хронической сердечной недостаточностью (ХСН). СД – это один из самых больших факторов риска ДСН. ДСН наблюдается у 40% больных СД и коррелирует она с плохим гликемическим контролем. Предполагаемыми механизмами диастолической дисфункции «диабетического сердца» являются:

- 1) аномалии в метаболизме макроэргических фосфатов,
- 2) нарушенный транспорт кальция,
- 3) внутритканевое (interstitial) накопление конечных продуктов гликозилирования,
- 4) нарушение баланса синтеза и деградации коллагена,

- 5) аномальные микрососудистые функции,
- 6) активация кардиальной ренин-ангиотензиновой системы,
- 7) снижение уровня адипонектина и,
- 7) нарушения метаболизма СЖК и глюкозы (75).

В дальнейших исследованиях изучались особенности метаболизма СЖК у пациентов с идиопатической дилатационной кардиомиопатией (ИДКМ). Обследовались 19 больных с ИДКМ (контрольная группа – 15 лиц). Метаболизм СЖК изучался с помощью позитронной эмиссионной томографии и 11-С пальмитата. Функции миокарда контролировались с помощью эхокардиографии. Как обнаружилось, у пациентов с ИДКМ было сниженное поглощение СЖК миокардом ($5,55 \pm 2,0$ против $6,4 \pm 1,2$ ммоль·100 г(-1)·мин(-1)), но при этом бета окисление СЖК нарушено не было. У всех пациентов с ИДКМ поглощение СЖК миокардом было обратно пропорционально фракции изгнания ЛЖ, что свидетельствует о том, что дальнейшее снижение функции ЛЖ приводит к усилению поглощения СЖК. Авторы делают вывод, что: «у пациентов с ИДКМ метаболизм СЖК понижен. Однако при дальнейшем падении функции ЛЖ и при ИР поглощение СЖК и их окисление повышаются» (75).

Повышенные уровни СЖК приводят так же к изменениям в вариабельности сердечного ритма. Такие изменения наблюдаются также и у пациентов с септическим шоком. Связано ли это с повышением уровней СЖК при сепсисе? Изучались повреждения миокарда и изменения вариабельности сердечного ритма у 31 пациента с сепсисом, из которых 12 выжили, а 19 скончались. В первый день поступления у всех пациентов были повышенные концентрации СЖК ($5,11 \pm 0,53$ мг/мл), но не у не выживших пациентов уровни СЖК были более высокими (по сравнению с выжившими) $6,88 \pm 0,13$ против $3,85 \pm 0,48$ мг/мл. Так же была найдена связь между повышенными уровнями СЖК и снижением вариабельности сердечного ритма. Сделан вывод, что: «повышенные уровни СЖК могут быть причиной повреждений сердца при сепсисе» (76).

В целом, плазменные уровни СЖК независимо от других параметров связаны с диастолической дисфункцией левого желудочка (74).

Что это факты могут дать для лабораторной медицины?

Повышенные СЖК – самый ранний маркер ишемии

В проспективном исследовании в течение 5 лет наблюдали 2103 мужчин, исходно не имевших ИБС. За этот период у 144 из них развилась ИБС. Как оказалось, повышенные натощак уровни СЖК (3-я тертиль) были связаны с повышением риска ИБС в 2 раза (по сравнению с нижней тертилью) (77).

В другом исследовании наблюдали 30 пациентов, поступивших в отделение неотложной терапии с ОКС (сердечная боль в течение 12 часов), у которых измеряли уровни тропонина I и СЖК. У 9 лиц был диагностирован ИМ. В течение 24 час после поступления у всех 9 лиц с ИМ уровни TnI повысились. При этом в каждом из 9 случаев повышения сTnI были повышенными и уровни СЖК. При поступлении высокие концентрации СЖК были у 28 из 30 пациентов (93%). У всех 9, у которых был диагностирован ИМ, уровни СЖК при поступлении были повышены (100%). Авторы делают вывод: «При ишемии СЖК повышаются независимо от наличия или отсутствия некроза миокарда, тестируемого по TnI» (78).

Аналогичные результаты были получены в исследовании, в котором уровни СЖК измеряли после коронарной ангиопластики. 22 пациентам, подвергшимся чрезкожной транслюминальной ангиопластике, плазменные уровни СЖК измеряли за 5 мин до и через 30 мин после операции. У всех больных постоперационные уровни СЖК были выше, чем предоперационные. Так, СЖК после операции уровень СЖК был в среднем в 14 раз выше, чем в норме! И хотя высокие уровни СЖК были у всех 22 пациентов, только у 11 после процедуры наблюдалось ишемическое изменение ST сегмента. У таких больных уровни СЖК были значительно выше, чем у пациентов без подъема ST – сегмента. Авторы считают, что «повышение сывороточного уровня СЖК отражает ишемию, вызываемую ангиопластикой; определение уровня СЖК – более чувствительный показатель степени ишемии, чем электрокардиографическое измерение» (79).

В общем, у пациентов без ишемии высокий уровень СЖК часто связан с комплексом преждевременных сокращений желудочков, что, в конечном счете, повышает риск ССЗ.

При ишемии концентрация СЖК повышается и имеет проаритмический эффект, вызывающий тахикардию (учащенные неритмичные сокращения желудочков).

И, в целом, повышенные уровни СЖК – показатель тяжести ишемии у «тропонин отрицательных» пациентов (79).

Однако повышенные уровни не только чувствительный количественный индикатор ишемии.

Повышенные уровни СЖК предсказывают внезапную смерть.

3315 лиц подвергавшихся коронарной ангиографии наблюдали в течение 6,85 лет. Заболевания коронарных артерий диагностированы у 2231 пациента. Внезапная смерть произошла у 165 больных. Повышенные уровни СЖК были связаны с повышенным риском внезапной смерти (80).

Приводят ли повышенные уровни СЖК к повышению тромбогенеза?

То, что при ИР нарушается процесс фибринолиза, что приводит к повышенному тромбообразованию, факт хорошо известный. Протромботическое состояние – это, как полагают, результат прямого действия гиперинсулинемии и связанных с ней метаболических патологий: постпрандиальной гипергликемии, гипертриглицеридемии и повышенных уровней СЖК (81). Одна из важнейших причин этого – большая масса адипозных клеток синтезирует большие количества ингибитора активатора плазминогена 1 (ИАП-1), что и понижает фибринолиз. ИАП-1 – это первичный ингибитор активации плазминогена *in vivo*, повышение уровня которого связано с повышением риска атеротромбоза, в особенности при ИР (82-83). Считается, что, по крайней мере, частично пониженный фибринолиз непосредственно связан с повышенными уровнями СЖК и триглицеридов (84). Первые сообщения о том, что высокие концентрации СЖК могут снижать фибринолиз *in vitro* появились еще в 1974 г (85). Затем, в опытах *in vitro* было показано, что в суспензии гомогенизированных сгустков СЖК ингибируют активность плазмина (86). В последующем исследовании, уже *in vivo*, после инфузии кроликам триглицеридов, через 3 часа наблюдали повышение концентрации СЖК с последующим (через 24 часа) плавным повышением уровнем фибриногена, альфа-1-антитрипсина. Через 48 ч ингибирующая фибринолиз активность сыворотки возросла до 202%. Авторы сделали вывод, что «...изменения в системе «фибриноген/фибринолизис» были индуцированы посредством повышения уровней СЖК» (87).

Однако ситуация, как это часто бывает, оказалась более сложной. Ингибирующее действие СЖК на фибринолиз зависит от того, происходит ли это в жидкой или в твердой фазе. Действительно, сначала было обнаружено, что *in vitro* олеиновая кислота ингибирует фибринолитическую активность, обеспечиваемую урокиназой, причем, чем выше была концентрация СЖК – тем выше ингибирование. Однако электрофоретический анализ продуктов фибринолиза показал, что олеиновая кислота повышает одновременно и аутокаталитическое расщепление новообразованных низкомолекулярных субъединиц плазмина. Более того, олеиновая кислота весьма эффективно вытесняла плазмин из комплекса «плазмин – полилизин-сефароза» (88).

И хотя тромболитический процесс обычно рассматривается как растворение плазмином фибринового матрикса тромбов, обычно из вида упускается, что *in vivo* в структуру сгустка входят дополнительные компоненты, такие как белки и фосфолипиды, и, в частности СЖК, которые и модулируют его солубилизацию (89).

Так, сравнительно недавно было открыта т.н., «тромболитическая барьерная функция фосфолипидов» (thrombolytic barrier function of phospholipids), которая базируется на том, что фосфолипиды, содержащиеся в тромбе, ограничивают диффузию и межмолекулярные взаимодействия фибринолитических ферментов. В фосфолипидном окружении конверсия плазминогена в плазмин, происходящая за счет активаторов плазминогена (например, за счет тканевого активатора плазминогена – ТАП) и протеолитическое действие плазмина значительно замедлены (90).

Какова же роль СЖК в фибринолизе? С помощью флуоресцентно меченного кардиального белка, связывающего СЖК (FABP) было показано, что СЖК действительно присутствуют в хирургически удаленных тромбах человека. В опытах *in vitro* было подтверждено, что высокие уровни СЖК более, чем на 90% ингибируют амидолитическую активность плазмина на синтетическом субстрате (Spectrozyme PL), но лишь частично ингибируют фибринолитическую активность, если она измеряется с помощью турбидиметрии. Применение хромогенных тестов показало, что активация плазминогена за счет ТАП полностью блокируется олеиновой кислотой в жидкой фазе, но активируется ею на фибриновом матриксе. В целом, данное исследование четко демонстрирует наличие в тромбах СЖК, которые оптимизируют матриксную функцию фибрина как матрицы для активации плазминогена с помощью ТАП и, тем самым, ускоряет фибринолиз за счет активаторов, которые попадают в сгусток из жидкой фазы. В итоге авторы делают весьма важный вывод, что «за счет стимуляции активации плазминогена на фибриновой матрице и ингибирования активаторов плазминогена и плазмина в жидкой фазе свободные жирные кислоты ограничивают

действие фибринолитических протеаз местом образования сгустка, где они частично противостоят барьерной функции фосфолипидов» (91).

Повышенные уровни СЖК – цель для терапии.

Если повышенные уровни СЖК вызывают такие тяжелые и потенциально фатальные патологии, в частности, ишемию, может быть, разработка и применение препаратов, снижающих концентрацию СЖК или блокирующих ее патологическое действие, будет действительно спасительной? Решению этой проблемы посвящено большое количество оригинальных исследований и аналитических обзоров. Некоторые авторы даже считают, что разработка препаратов, способных контролировать ишемию у диабетических пациентов и предохранять функции ЛЖ будет новой эрой в кардиологии. Полагается, что наиболее перспективными препаратами для этого могут стать Trimetazidine, Dichloroacetate, Perhexiline и Etomoxir (92-96).

Порочный круг повышения уровней СЖК

Итак, повышение уровня СЖК затягивает больного в спираль патологических событий:

1. СЖК накапливаются в жировых тканях, концентрация СЖК в крови повышается.
2. Накопление СЖК в скелетных мышцах, не предназначенных для депонирования СЖК, ведет к патологическому метаболизму СЖК, интермедиаты которого вызывают ИР.
3. Адипоцитокнины, в больших количествах секретиромые большой массой адипозных клеток, нарушают гомеостаз глюкозы,.
3. ИР еще больше повышает концентрацию СЖК в крови и в печени.
4. Повышение концентрации СЖК:
 - нарушает метаболизм холестерина в печени,
 - приводит к оксидативному стрессу в сосудистой системе и к эндотелиальной дисфункции, что ведет к ишемической болезни сердца.
5. Ишемия еще больше повышает уровень СЖК.
6. См. # 1.

Своевременное определение концентрации СЖК в крови может стать выходом из этого порочного круга.

Методы измерения концентрации СЖК.

Экстракция СЖК с помощью органических растворителей и фотоколориметрия.

Ранние методы определения концентрации СЖК в крови основывались на СЖК экстракции в органическую фазу. В оригинальном методе, опубликованном еще в 1956 г., для этого применялась смесь изопропиловый спирт – гептан, с помощью которой СЖК экстрагировались из плазмы и затем титровались с помощью NaOH (97). Затем были разработаны многочисленные модификации этого метода, в которых вместо титрования СЖК, экстрагированных из плазмы, применялось фотоколориметрическое определение их окрашенных комплексов. Так, после экстракции толуолом или бензолом к СЖК добавлялись ионы уранила и щелочной краситель Rhodamine B, с последующим измерением интенсивности окраски (98). В другом методе экстракцию СЖК из плазмы проводили с помощью смеси хлороформ:гептан:метанол, а затем проводили образование комплекса с кобальтом, который и определялся с 1-нитрозо-2-нафтола (99).

Микрометод, предназначенный для фотоколориметрического определения СЖК в плазме предусматривал их экстракцию смесью хлороформ:гептан:метанол с последующим добавлением кремниевой кислоты для удаления интерферирующих фосфолипидов. Хромофорный комплекс СЖК – Cu получали с помощью дифенилкарбазона, содержащего дифенилкарбазид (100).

И хотя эти методы достаточно точны, они также весьма многостадийны и трудоемки, требуют регулярного приготовления свежих растворов и большой аккуратности, необходимой для обеспечения нужной точности.

Определение СЖК с помощью газо-жидкостной хроматографии - ГЖХ

Для измерения уровней СЖК с помощью ГЖХ, необходимы: 1) предварительная экстракция СЖК в органическую фазу или получение препарата СЖК с помощью тонкослойной хроматографии, 2) концентрирование полученного образца, 3), метилирование

сконцентрированного образца, 4) собственно ГЖХ полученных метиловых эфиров СЖК (101 -104). Сравнение точности и эффективности определения СЖК с помощью ГЖХ, с помощью колориметрического и ферментативного метода (о ферментативном методе - см. ниже), проведенное в 1983 г., показало, что все три метода дают хорошо совпадающие результаты. Но при этом авторы пришли к выводу, что «из-за своей низкой стоимости (время, реагенты, приборы) и достаточной точности, ферментативный метод определения СЖК наиболее предпочтителен» (105).

Определение СЖК с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Применение ВЭЖХ для определения концентрации СЖК также включает их экстракцию в органическую фазу (106) с последующей дериватизацией. При этом достигаются высокая чувствительность (предел определения 2 пикомоля) и возможность определять не суммарную концентрацию смеси СЖК, а концентрации их индивидуальных фракций (C12 – C22) (107). Сравнение эффективности определения СЖК с помощью капиллярной ГЖХ и с помощью ВЭЖХ в обращенной фазе показало, что точность и чувствительность обоих методов является сходной (108).

С помощью прямой дериватизации СЖК в сыворотке разработан метод определения их концентрации с помощью ВЭЖХ в обращенной фазе с последующей флуоресцентной детекцией.. Дериватизация проводилась с помощью гидразина 6,7 диметокси-1-этил-2(1H)-хиноксалинон-3 пропионкарбоксылной кислоты (6,7-dimethoxy-1-methyl-2(1H)-quinoxalinone-3-propionylcarboxylic acid hydrazide) в водной среде в присутствии пиридина и 1-этил-3-(3-диметиламинопропила) карбодиимида (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide). Образовавшиеся дериваты разделялись на колонке с обращенной фазой с градиентной элюцией водным раствором ацетонитрила с последующим флуориметрическим определением. При этом была достигнута исключительно высокая точность измерений концентрации индивидуальных СЖК с пределом определений в 2,5-5,0 фемтомолей в образце сыворотки, составлявшем 5 микролитров. И хотя, как утверждают авторы «этот метод прост и не требует обычной стадии экстракции» (109), вряд ли его можно рекомендовать для рутинной практики лабораторной диагностики.

Хромато-масс-спектрометрическое определение СЖК

Применение подхода, сочетающего ГЖХ и масс-спектрометрию (МС) позволяет идентифицировать все СЖК сыворотки крови и определить их основные характеристики (время удержания и типичные спектры индивидуальных жирных кислот) (110). Результаты анализа метиловых эфиров СЖК в плазме с помощью ГЖХ-МС часто зависят от их концентрации в образце. Для решения этой проблемы СЖК, содержащиеся в образце, дериватизировались с помощью триметилсилила (111). Разработка ГЖХ-МС метода, позволяющего одновременное определение СЖК плазмы и их 3-гидрокси-аналогов за счет избирательной дериватизации гидроксильных групп путем трифлуороацетилрования (trifluoroacetylation) и карбоксильных групп путем трет-бутилдиметилсилилирования (tert-butyldimethylsilylation) позволила выявить закономерности нарушения бета-окисления СЖК в митохондриях (112). В целом, определение СЖК с помощью ГЖХ-МС – это, безусловно, высокоэффективный подход, позволяющий сравнительно быстро и точно измерять концентрации индивидуальных СЖК и их производных и решать большой спектр научных задач (112,113).

Определение концентрации СЖК с помощью радиоактивных изотопов

Применение инфузии радиоактивно меченных СЖК (¹³C или ¹⁴C) позволяет эффективно изучать *in vivo* динамику накопления СЖК в плазме и их окисления в миокарде (114-116). Введение меченных СЖК собакам позволяет определять кинетику СЖК в диапазоне фемтомолей и пикомолей и с коэффициентом вариации менее, чем 2%. Однако для оптимальной точности метку надо вводить непосредственно в левый желудочек (117). Внутривенное введение ¹⁴C СЖК здоровым добровольцам позволяет изучать закономерности окисления СЖК при гипoinsулинемии, экспериментально индуцированной соматостатином (118). В целом, измерение кинетики накопления и окисления СЖК с помощью радиоактивных меток метод весьма перспективный, но, пожалуй, только для научных исследований (119-121).

Белок, связывающий СЖК: применение для измерения концентрации СЖК.

Белки, связывающие СЖК (fatty acid-binding proteins – FABPs, см. стр 3), относятся к суперсемейству липид-связывающих белков (lipid-binding proteins - LBP), локализуемых в различных тканях. Это: 1) L-FABP (локализуется в печени - liver), 2) I-FABP (локализуется в кишечнике - intestinal), 3) H-FABP (локализуется в мышцах и в сердце - heart), 4) A-FABP (локализуется в адипоцитах - adipocyte), 5) E-FABP (эпидермальный - epidermal), 6) I1-FABP (локализуется в подвздошной кишке - ileal), 7) B-FABP (мозговой - brain), 8) M-FABP (миелиновый - myelin) и, 9) T-FABP (тестикулярный - testis). Их основная роль - регуляция поглощения и транспорта СЖК в соответствующих тканях. Все они имеют сходную белковую структуру, каждая молекула способна связывать только один лиганд (СЖК, холестерин или ретинол) (122-124).

Свойство белков FABP семейства специфически связывать СЖК, когда при этом каждая молекула связывает только одну молекулу СЖК, открывает возможности использования этих белков для определения концентрации СЖК. Впервые измерение уровней СЖК с помощью FABP было описано в 1992 г (125). Был получен флуоресцентно меченный I-FABP, названный ADIFAB (acrylodated intestinal fatty acid binding protein). Одна молекула флуоресцентного соединения - акрилодана (acrylodan) связывается с одной молекулой I-FABP (препарат I-FABP получен из кишечника крыс). При связывании ADIFAB с жирными кислотами происходит сдвиг волны эмиссии флуоресценции от 432 нм до 505 нм. Определение соотношений интенсивностей эмиссии флуоресценции позволяет измерять концентрацию СЖК, связавшихся с ADIFAB (125-128).

Детальная проверка степени точности этого метода в зависимости от наличия в среде третьей фазы (в которую могут входить альбумин, другие белки, связывающие СЖ, мембраны) показала: «что флуоресценция ADIFAB зависит от типа и количества превалирующих в среде ионов и что построение калибровочных кривых должно проводиться в условиях, не соответствующих ранее опубликованным». В целом, авторы приходят к выводу, что «в применении ADIFAB для измерения концентраций СЖК *in vivo* есть предостережения для тех случаев, когда точный состав окружающей среды в пробе или не известен или не может быть проконтролирован точно» (129).

Ферментативные методы определения СЖК.

Ферментативный спектрометрический метод для прямого определения концентрации СЖК в плазме (без экстракции СЖК) был опубликован в 1972 г. Метод основывался на применении ацил-КоА синтетазы, миокиназы, пируваткиназы и лактатдегидрогеназы по схеме:

$\text{СЖК} + \text{КоА} + \text{АТФ} \rightarrow \text{ацил КоА синтетазы} \rightarrow \text{ацил КоА} + \text{АМФ} + \text{пирофосфат } \Phi\text{-}\Phi,$
 $\text{АМФ} + \text{АТФ} \rightarrow \text{миокиназа} \rightarrow 2 \text{ АДФ},$
 $2 \text{ АДФ} + 2 \text{ фосфоенолпируват} \rightarrow \text{пируваткиназа} \rightarrow 2 \text{ АДФ} + 2 \text{ фосфоенолпируват}$
 $2 \text{ пируват} + 2 \text{ НАДН} \rightarrow \text{лактатдегидрогеназа} \rightarrow 2 \text{ лактат} + 2 \text{ НАД}$
со спектрометрическим измерением НАД (130).

Затем была предложена модификация этого метода с применением ацил-КоА синтетазы, ацил КоА оксидазы и пероксидазы. СЖК активировались с помощью ацил-КоА синтетазы в присутствии АТФ и Ко А. Образовавшийся ацил-КоА окислялся с помощью ацил-КоА оксидазы до енол-КоА с одновременным образованием H₂O₂. H₂O₂ связанная 4-амино-антипирином и 2,4 дибромфенолом в присутствии пероксидазы дает продукт с максимумом адсорбции при 505 нм (131).

В следующей модификации этого метода также использовались ацил-КоА синтетазы и ацил-КоА оксидаза. Образовавшаяся H₂O₂ измерялась при 550 нм в присутствии каталазы и 4-амино-3-гидроксино-5-меркапто-1,2,4 триазола (132).

Биолюминисцентный метод был также основан на активации СЖК с помощью ацил КоА синтетазы. Образовавшийся пирофосфат фосфорилировал фруктозо-6-фосфат в реакции, катализируемой пирофосфат-фруктозо-6-фосфаттрансферазой. Триозофосфат, образовавшийся из фруктозо 1,6-бисфосфата за счет альдолазы, окислялся до 3-фосфоглицерата за счет НАД и в присутствии арсената. Образование НАДН определяли за счет НАДн зависимой бактериальной люциферазы (133).

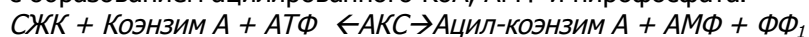
Позднее был предложен метод также, основанный на ацетилировании длинных цепей жирных кислот бактериальной ацил-КоА синтетазой, продуцирующей эквивалентные количества Ацил-КоА и АМФ, Однако концентрация АМФ измерялась в сопряженной реакции миокиназы, пируваткиназы и лактатдегидрогеназы, позволяющей измерение НАДН. При этом два моля НАД образовывались из одного моля ацетилированных жирных кислот (134).

Значительный прогресс в совершенствовании ферментативного измерения концентрации СЖК был достигнут, когда был разработан упрощенный метод, основанный на расщеплении пирогосфата (образующегося в результате тиоэтерификации СЖК с помощью АТФ и СоА в присутствии ацетил-СоА синтетазы) до неорганического фосфата. Образовавшийся фосфат определяли в реакции с молибдатом. При этом нижний определяемый предел составлял 0,018 ммоль/л, а зона линейности находилась в диапазоне от 0,02 до 2,0 ммоль/л (135). Первый коммерческий набор, предназначенный для ферментативного колориметрического измерения концентрации СЖК в плазме, был разработан фирмой WAKO Chemicals, USA, Inc., США на основе этого метода.

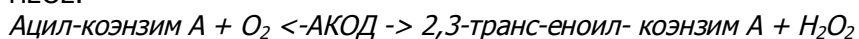
Дальнейшее и значительное улучшение ферментативного метода определения СЖК сделано компанией DiaSys – Diagnostics Systems International, Германия.

Определения концентрации СЖК с помощью набора NEFA FS, DiaSys.

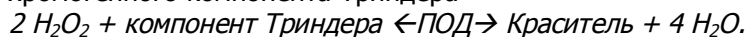
1. СЖК и коэнзим А взаимодействуют в присутствии ацил-коэнзим-А-синтетазы (АКС) с образованием ацилированного КоА, АМФ и пирогосфата.



2. Ацилированный КоА окисляется с помощью ацил-коэнзим-А-оксидазы (АКОД) с выделением H₂O₂.



3. H₂O₂ образует окрашенный продукт в присутствии пероксидазы (ПОД) и при использовании хромогенного компонента Триндера*



Измеренная при 546 нм интенсивность красного красителя прямо пропорциональна концентрации неэтерифицированных жирных кислот в образце. (*Метод Триндера, основан на колориметрическом определении продуктов реакции H₂O₂ с 4-аминоантипирином (пара-аминоантипирином, PAP) в присутствии 2,4-дихлорфенолсульфата).

Набор NEFA FS - это готовый к немедленному употреблению жидкий стабильный реагент, простой в применении, не имеющий токсичности и идеально подходящий для рутинной лабораторной диагностики.

Практические рекомендации.

1. Концентрации СЖК в плазме в течение суток могут колебаться, в частности, повышаться после приема пищи. Измерения уровней СЖК следует проводить натощак.

2. При необходимости, каждая лаборатория должна проверить, применим ли контрольный диапазон величин к местному населению, и определить свой собственный диапазон нормальных величин.

3. Для диагностических целей значения СЖК всегда должны рассматриваться в сочетании с анамнезом, клиническим обследованием и другими данными.

4. При избыточном весе и подозрении на МС и СД уровни СЖК целесообразно измерять в сочетании с измерениями уровней глюкозы и гликозилированного гемоглобина.

5. При диагностике ССЗ и, в особенности, ИБС уровни СЖК целесообразно измерять в сочетании с измерениями уровней общего холестерина, Х-ЛПНП, Х-ЛПВП, триглицеридов, с измерениями концентраций апополипротеинов В и А.

6. При оценке степени ишемии при кардиохирургических операциях измерение уровней СЖК следует проводить до и после хирургического вмешательства.

7. При оценках рисков развития ССЗ измерение уровней СЖК целесообразно проводить в сочетании с высокочувствительным измерением С-реактивного белка и измерением концентраций апополипротеинов В и А.

Литература

1. Park YW, Zhu S, Palaniappan L, et al.. B. The metabolic syndrome: prevalence and associated risk factor findings in the US population from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Arch Intern Med.* 2003; 163(4):427-436.
2. Brunner EJ, Marmot MG, Nanchahal K, et al. Social inequality in coronary risk: central obesity and the metabolic syndrome. Evidence from the Whitehall II study. *Diabetologia.* 1997; 40(11):1341-1349.
3. Perel P, Langenberg C, Ferrie J et al. Household Wealth and the Metabolic Syndrome in the Whitehall II Study. *Diabetes Care.* 2006;29(12):2694-2700.
4. Brunner E, Shipley MJ, Blane D, et al. When does cardiovascular risk start? Past and present socioeconomic circumstances and risk factors in adulthood. *J Epidemiol Community Health.* 1999; 53(12):757-776.
5. Bloch-Damti A, Bashan N. Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.* 2005;7(11-12):1553-1567
6. Tsirpanlis G, Inflammation in Atherosclerosis and Other Conditions: A Response to Danger. *Kidney Blood Press Res.* 2005; 28: 211-217
7. Kelley DE, Mandarino LJ. Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination. *Diabetes.* 2000; 49(5):677-683.
8. van der Vusse GJ, van Bilsen M, Glatz JF, et al. Critical steps in cellular fatty acid uptake and utilization. *Mol Cell Biochem* 2002; 239:9-15.
9. Aras O, Dilsizian V. Targeting ischemic memory. *Current Opinion in Biotechnology* 2007, 18:46-51.
10. Delarue J, Magnan C. Free fatty acids and insulin resistance. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2007; 10 (2):142-148.
11. O'Donoghue M, de Lemos JA, Morrow DA, et al. S. Prognostic utility of heart-type fatty acid binding protein in patients with acute coronary syndromes. *Circulation.* 2006;114(6):550-557.
12. Kilcullen N, Viswanathan K, Das R et al. Heart-type fatty acid-binding protein predicts long-term mortality after acute coronary syndrome and identifies high-risk patients across the range of troponin values. *Am Coll Cardiol.* 2007; 50(21):2061- 2067.
13. Pittas AG, Joseph NA, Greenberg AS. Adipocytokines and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89(2):447-452.
14. Hotamisligil GS. Molecular mechanisms of insulin resistance and the role of the adipocyte. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2000;24 Suppl 4:S23-27.
15. Wellen KE, Hotamisligil GS. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2003; 112(12):1785-1788
16. Cressin SR, Greenough WB, Steinberg D: Stimulation of insulin secretion by long-chain free fatty acids. *J Clin Invest* 1973, 52:1979-1984.
17. Balent B, Goswami G, Goodloe G, et al.: Acute elevation of NEFA causes hyperinsulinemia without effect on insulin secretion rate in healthy human subjects. *Ann N Y Acad Sci* 2002, 967:535-543.
18. Boden G: Obesity, free fatty acids, and insulin resistance. *Curr Opin Endocrinol Diab.* 2001, 8:235-239.
19. Benjamin SM, Valdez R, Geiss LS, et al.: Estimated number of adults with prediabetes in the US in 2000: opportunities for prevention. *Diabetes Care* 2003, 26:645-649.
20. Jensen CB, Storgaard H, Holst JJ, et al.: Insulin secretion and cellular glucose metabolism after prolonged low-grade intralipid infusion in young men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003, 88:2775-2783.
21. Kashyap S, Belfort R, Gastaldelli A, et al.: A sustained increase in plasma free fatty acids impairs insulin secretion in nondiabetic subjects genetically predisposed to develop type 2 diabetes. *Diabetes* 2003, 52:2461-2474.
22. Young ME, McNulty P, Taegtmeyer H. Adaptation and maladaptation of the heart in diabetes. Part II: potential mechanisms. *Circulation* 2002; 105 (15): 1861-1870
23. Iozzo P, Chareonthaitawee P, Dutka D, et al. Independent association of type 2 diabetes and coronary artery disease with myocardial insulin resistance. *Diabetes* 2002; 51 (10): 3020-3024
24. Fang ZY, Prins JB, Marwick TH. Diabetic cardiomyopathy: evidence, mechanisms, and therapeutic implications. *Endocr Rev.* 2004;25(4):543-567
25. Park TS, Yamashita H, Blaner WS et al.. Lipids in the heart: a source of fuel and a source of toxins. *Curr Opin Lipidol.* 2007; 18(3):277-282.
26. Rodrigues B, Cam MC, McNeill JH. Metabolic disturbances in diabetic cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem.* 1998 Mar;180(1-2):53-57.

27. DeFronzo RA. Dysfunctional fat cells, lipotoxicity and type 2 diabetes. : Int J Clin Pract Suppl. 2004(143):9-21.
28. Unger RH: Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM: genetic and clinical implications. *Diabetes* 1995, 44: 863–870
29. Joseph JW, Koshkin V, Saleh MC et al. Free fatty acid-induced beta-cell defects are dependent on uncoupling protein 2 expression. *J Biol Chem*. 2004; 279(49):51049-51056.
30. Haber EP, Procópio J, Carvalho CR et al. R. New insights into fatty acid modulation of pancreatic beta-cell function. *Int Rev Cytol*. 2006; 248:1-41.
31. Nolan CJ, Madiraju MS, Delghingaro-Augusto V, et al. Fatty acid signaling in the beta-cell and insulin secretion. *Diabetes*. 2006;55 Suppl 2:S16-23
32. Newsholme P, Keane D, Welters HJ, et al. Life and death decisions of the pancreatic beta-cell: the role of fatty acids. *Clin Sci (Lond)*. 2007;112(1):27-42
33. Cunha DA, Hekerman P, Ladière L et al. Initiation and execution of lipotoxic ER stress in pancreatic beta-cells. : *J Cell Sci*. 2008 Jun 17
34. Weinberg JM. Lipotoxicity. *Kidney Int*. 2006; 70(9):1560-1566
35. Rebrin K, Steil GM, Getty L et al. Free fatty acid as a link in the regulation of hepatic glucose output by peripheral insulin. *Diabetes* 1995, 44:1038–1045,
36. Cnop M. Fatty acids and glucolipotoxicity in the pathogenesis of Type 2 diabetes. *Biochem Soc Trans*. 2008; 36(Pt 3):348-352
37. Unger RH: Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM: genetic and clinical implications. *Diabetes* 1995, 44: 863–870
38. Lewis GF, Carpentier A, Adeli K et al. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr Rev*. 2002; 23(2):201-229
39. Heilbronn L, Smith SR, Ravussin E. Failure of fat cell proliferation, mitochondrial function and fat oxidation results in ectopic fat storage, insulin resistance and type II diabetes mellitus. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2004; 28 Suppl 4:S12-21.
40. Paolisso G, Tataranni PA, Foley JE, et al. E. A high concentration of fasting plasma non-esterified fatty acids is a risk factor for the development of NIDDM. : *Diabetologia*. 1995; 38(10):1213-1217.
41. Charles MA, Eschwège E, Thibault N, et al. The role of non-esterified fatty acids in the deterioration of glucose tolerance in Caucasian subjects: results of the Paris Prospective Study. *Diabetologia*. 1997; 40(9):1101-1106.
42. Pankow JS, Duncan BB, Schmidt MI, Fasting plasma free fatty acids and risk of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study. *Diabetes Care*. 2004; 27(1):77-82.
43. Blaak EE. Metabolic fluxes in skeletal muscle in relation to obesity and insulin resistance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2005;19(3):391-403.
44. Cahová M, Vavřínková H, Kazdová L. Glucose-fatty acid interaction in skeletal muscle and adipose tissue in insulin resistance. *Physiol Res*. 2007; 56(1):1-15.
45. Zierath JR. The path to insulin resistance: paved with ceramides? *Cell Metab*. 2007; 5(3):161-163.
46. Stratford S, Hoehn KL, Liu F, Summers SA. Regulation of insulin action by ceramide: dual mechanisms linking ceramide accumulation to the inhibition of Akt/protein kinase B. *J Biol Chem*. 2004;279(35):36608-36615
47. Adams JM 2nd, Pratipanawatr T, Berria R et al.. Ceramide content is increased in skeletal muscle from obese insulin-resistant humans. *Diabetes*. 2004;53(1):25-31.
48. Straczkowski M, Kowalska I, Baranowski M, et al. Increased skeletal muscle ceramide level in men at risk of developing type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2007; 50(11):2366-2373
49. Holland WL, Brozinick JT, Wang LP, et al. Inhibition of ceramide synthesis ameliorates glucocorticoid-, saturated-fat-, and obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab*. 2007; 5(3):167-179.
50. Pickersgill L, Litherland GJ, Greenberg AS et al.. Key role for ceramides in mediating insulin resistance in human muscle cells. *J Biol Chem*. 2007; 282(17):12583-12589.
51. Summers SA. Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Prog Lipid Res*. 2006;45(1):42-72
52. Timmers S, Schrauwen P, de Vogel J. Muscular diacylglycerol metabolism and insulin resistance. *Physiol Behav*. 2007 Dec 14
53. Bonen A, Parolin ML, Steinberg GR et al. Triacylglycerol accumulation in human obesity and type 2 diabetes is associated with increased rates of skeletal muscle fatty acid transport and increased sarcolemmal FAT/CD36. *FASEB J*. 2004;18(10):1144-1146.

54. Kraegen EW, Cooney GJ, Ye J, et al. Triglycerides, fatty acids and insulin resistance--hyperinsulinemia. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2001;109 (4): S516-526
55. Kelley DE, Goodpaster BH, Storlien L. Muscle triglyceride and insulin resistance. *Annu Rev Nutr*. 2002;22:325-346.
56. Goodpaster BH, Wolf D. Skeletal muscle lipid accumulation in obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes. *Pediatr Diabetes*. 2004;5(4):219-26
57. Hulver MW, Dohm GL. The molecular mechanism linking muscle fat accumulation to insulin resistance. *Proc Nutr Soc*. 2004; 63(2):375-380
58. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006 ;444(7121):860-867.
59. Jellinger PS. Metabolic consequences of hyperglycemia and insulin resistance. *Clin Cornerstone*. 2007; 8 Suppl 7:S30-42
60. Byrne CD, Wareham NJ, Brown DC, et al. Hypertriglyceridaemia in subjects with normal and abnormal glucose tolerance: relative contributions of insulin secretion, insulin resistance and suppression of plasma non-esterified fatty acids. *Diabetologia*. 1994; 37: 889-896
61. Avramoglu RK, Basciano H, Adeli K. Lipid and lipoprotein dysregulation in insulin resistant states. *Clin Chim Acta*. 2006;368(1-2):1-19.
62. Miles JM, Nelson RH. Contribution of triglyceride-rich lipoproteins to plasma free fatty acids. *Horm Metab Res*. 2007;39(10):726 - 729.
63. Adiels M, Olofsson SO, Taskinen MR, et al. Overproduction of very low-density lipoproteins is the hallmark of the dyslipidemia in the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28(7):1225-1236.
64. Steinberg HO, Baron AD. Vascular function, insulin resistance and fatty acids. *Diabetologia* 2002; 45:623-634.
65. Tripathy D, Mohanty P, Dhindsa S, et al. Elevation of free fatty acids induces inflammation and impairs vascular reactivity in healthy subjects. *Diabetes*. 2003;52(12):2882-2887.
66. Shankar SS, Steinberg HO. FFAs: do they play a role in vascular disease in the insulin resistance syndrome? *Curr Diab Rep*. 2005 Feb;5(1):30-35
68. Oprescu AI, Bikopoulos G, Naassan A, et al. Free fatty acid-induced reduction in glucose-stimulated insulin secretion: evidence for a role of oxidative stress in vitro and in vivo. *Diabetes*. 2007; 56(12):2927-2937.
69. Chinen I, Shimabukuro M, Yamakawa K, et al. Vascular lipotoxicity: endothelial dysfunction via fatty-acid-induced reactive oxygen species overproduction in obese Zucker diabetic fatty rats. *Endocrinology*. 2007; 148(1):160-165.
70. Kelley DE. Skeletal muscle triglycerides. an aspect of regional adiposity and insulin resistance. *Ann NY Acad Sci* 2001; 967: 135-145
71. Ukropcova B, McNeil M, Sereda O, et al. Dynamic changes in fat oxidation in human primary myocytes mirror metabolic characteristics of the donor. *J Clin Invest* 2005; 115: 1934-1941
72. Fang KM, Lee AS, Su MJ, et al. Free fatty acids act as endogenous ionophores, resulting in Na⁺ and Ca²⁺ influx and myocyte apoptosis. *Cardiovasc Res*. 2008;78(3):533-545
73. Hendrickson SC, et al. Free fatty acid metabolism during myocardial ischemia and reperfusion. *Mol Cell Biochem*. 1997; 166(1-2):85-94. .
74. Leichman JG, Aguilar D, King TM et al , Association of plasma free fatty acids and left ventricular diastolic function in patients with clinically severe obesity. *Am J Clin Nutr*. 2006 ;84(2):336-341.
75. Tsujino T, Kawasaki D, Masuyama T. Left ventricular diastolic dysfunction in diabetic patients: pathophysiology and therapeutic implications. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2006;6(4):219-230.
75. Tuunanen H, Engblom E, Naum A, et al. Decreased myocardial free fatty acid uptake in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy: evidence of relationship with insulin resistance and left ventricular dysfunction. *J Card Fail*. 2006; 12(8):644-652
76. Nogueira AC, Kawabata V, Biselli P, et al. Changes in plasma free fatty acid levels in septic patients are associated with cardiac damage and reduction in heart rate variability. *Shock*. 2008; 29(3):342-328.
77. Pirro M et al. Plasma free fatty acid levels and the risk of ischemic heart disease in men: prospective results from the Québec Cardiovascular Study. *Atherosclerosis*. 2002; 160(2): 377-378.
78. Apple FS, et al Unbound Free Fatty Acid Concentrations Are Increased in Cardiac Ischemia, *Clin Proteomics*, 2004, 1, 1, 41-44.
79. Kleinfeld AM, et al. Increases in serum unbound free fatty acid levels following coronary angioplasty. *Am J Cardiol*. 1996 15; 78(12): 1350-1354

80. Pilz S, et al. Elevated plasma free fatty acids predict sudden cardiac death: a 6.85-year follow-up of 3315 patients after coronary angiography. *Eur Heart J.* 2007; 28(22):2763-2769.
81. Schneider DJ Abnormalities of coagulation, platelet function, and fibrinolysis associated with syndromes of insulin resistance. *Coron Artery Dis.* 2005; 16(8):473-476.
82. Juhan-Vague I, Alessi MC, Morange PE. Hypofibrinolysis and increased PAI-1 are linked to atherothrombosis via insulin resistance and obesity. *Ann Med.* 2000; 32 Suppl 1:78-84.
83. Alessi MC, Morange P, Juhan-Vague I. Fat cell function and fibrinolysis, *Horm Metab Res.* 2000 ; 32(11-12):504-8.
82. Juhan-Vague I, Alessi MC, Morange PE. Hypofibrinolysis and increased PAI-1 are linked to atherothrombosis via insulin resistance and obesity. *Ann Med.* 2000; 32 Suppl 1:78-84.
83. Alessi MC, Morange P, Juhan-Vague I. Fat cell function and fibrinolysis, *Horm Metab Res.* 2000 ; 32(11-12):504-8.
84. Sobel BE. Fibrinolysis and diabetes. *Front Biosci.* 2003; 8:1085-1092.
85. Korsan-Bengtzen K, Holm T. Free fatty acids (FFA)--blood clotting, fibrinolysis and platelet function. *Scand J Haematol.* 1974; 13(1):64-71.
86. Muraoka T, Okuda H. Effects of free fatty acids on fibrinolytic activity. *J Biochem.* 1977; 2(2):529-533.
87. Pickart L. Free fatty acidemia as an inducer of systemic hyperfibrinogenemia and fibrinolytic inhibition. *Inflammation.* 1981; 5(1):61-70.
88. Higazi AA, Aziza R, Samara AA et al Regulation of fibrinolysis by non-esterified fatty acids. *Biochem J.* 1994; 300 (Pt 1):251-255
89. Kolev K, Longstaff C, Machovich R. Fibrinolysis at the fluid-solid interface of thrombi. *Curr Medic Chem Cardiovasc Hematol Agents* 2005; 3: 341-355.
90. Varadi B, Kolev K, Tenekedjiev K et al. Phospholipid-barrier to fibrinolysis: role for the anionic polar head charge and the gel-phase crystalline structure. *J Biol Chem* 2004; 279: 39863-39871.
91. Rábai G, Váradi B, Longstaff C, et al. Fibrinolysis in a lipid environment: modulation through release of free fatty acids. *J Thromb Haemost.* 2007;5(6):1265-1273
92. Fragasso G, Palloshi A, Puccetti P et al. A randomized clinical trial of trimetazidine, a partial free fatty acid oxidation inhibitor, in patients with heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2006; 48(5):992-998
93. Fragasso G, Spoladore R, Bassanelli G, et al. New directions in the treatment of heart failure: targeting free fatty acid oxidation. *Curr Heart Fail Rep.* 2007; 4(4):236-242.
94. Di Napoli P, Di Giovanni P, Gaeta MA, et al. Trimetazidine and reduction in mortality and hospitalization in patients with ischemic dilated cardiomyopathy: a post hoc analysis of the Villa Pini d'Abruzzo Trimetazidine Trial. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2007; 50(5):585-589
95. Marazzi G, Wajngarten M, Vitale C et al. Effect of free fatty acid inhibition on silent and symptomatic myocardial ischemia in diabetic patients with coronary artery disease. *Int J Cardiol.* 2007;120(1):79-84
96. Marazzi G, Volterrani M, Rosano GM. Metabolic agents in the management of diabetic coronary patients: a new era. *Int J Cardiol.* 2008;127(1):124-125.
97. Dole, V. P. 1956. A relation between nonesterified fatty acids in plasma and the metabolism of glucose. *J Clin Invest.* 1956; 35(2): 150-154.
98. Mackenzie RD, Blohm TR, Auxier EM, Luther AC. Rapid colorimetric micromethod for free fatty acids. : *J Lipid Res.* 1967; 8(6):589-597
99. De Villiers S, Van Der Walt JG, Procos J. An accurate, sensitive and reproducible method for the colorimetric estimation of free fatty acids in plasma. *Onderstepoort J Vet Res.* 1977 ;44(3):169-172.
100. Hron WT, Menahan LA. A sensitive method for the determination of free fatty acids in plasma. *J Lipid Res.* 1981;22(2):377-381
101. Ko H, Royer ME. A gas-liquid chromatographic assay for plasma free fatty acids. *J Chromatogr.* 1974 Jan 30;88(2):253-263.
102. Höckel M, Dünge W, Holzer A, et al. A microliter method for the gas chromatographic determination of long-chain non-esterified fatty acids in human serum or plasma. *J Chromatogr.* 1980 ;221(2):205-214.
103. Brunk SD, Swanson JR. Colorimetric method for free fatty acids in serum validated by comparison with gas chromatography. *Clin Chem.* 1981; 27(6):924-926.
104. Tserng KY, Kliegman RM, Miettinen EL, et al. A rapid, simple, and sensitive procedure for the determination of free fatty acids in plasma using glass capillary column gas-liquid chromatography. *J Lipid Res.* 1981 Jul;22(5):852-858.

105. Mulder C, Schouten JA, Popp-Snijders C. Determination of free fatty acids: a comparative study of the enzymatic versus the gas chromatographic and the colorimetric method. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1983; 21(12):823-827
106. Uji Y, Noma A, Shiraki M, et al. Separation and quantitation of plasma free fatty acids as phenacyl esters by HPLC. *Biomed Chromatogr.* 1987; 2(3):110-114
107. Püttmann M, Krug H, von Ochsenstein E, et al. Fast HPLC determination of serum free fatty acids in the picomole range. *Clin Chem.* 1993; 39(5):825-832.
108. Baty JD, Willis RG, Tavendale R. A comparison of methods for the high-performance liquid chromatographic and capillary gas-liquid chromatographic analysis of fatty acid esters. *J Chromatogr.* 1986 ;353:319-328.
109. Iwata T, Inoue K, Nakamura M, et al. Simple and highly sensitive determination of free fatty acids in human serum by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Biomed Chromatogr.* 1992;6(3): 120-123
110. РезвухинаЛ, Шалаурова ИЮ, Потапова ИА, Алябьева И А. Хромато-масс-спектрометрическое определение свободных жирных кислот в сыворотке крови. *Вопр. мед. химии,* 1993, 39(5), 55-58.
111. Hernández-Pérez JM, Cabré E, Fluvia L, Motos A, e al. Improved method for gas chromatographic-mass spectrometric analysis of 1-(13)C-labeled long-chain fatty acids in plasma samples. *Clin Chem.* 2002; 48(6 Pt 1):906-912.
112. Costa CG, Dorland L, Holwerda U, et al. Simultaneous analysis of plasma free fatty acids and their 3-hydroxy analogs in fatty acid beta-oxidation disorders. *Clin Chem.* 1998 ;44(3):463-471
113. Magni F, Piatti PM, Monti LD, et al. Fast gas chromatographic-mass spectrometric method for the evaluation of plasma fatty acid turnover using [1-13C]palmitate. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 1994; 657(1):1-7.
114. Spitzer JJ. Application of tracers in studying free fatty acid metabolism of various organs in vivo. *Fed Proc.* 1975;34(13):2242-2245.
115. Miles JM, Ellman MG, McClean KL, et al Validation of a new method for determination of free fatty acid turnover. *Am J Physiol.* 1987;252(3 Pt 1):E431-438
116. Jensen MD, Heiling V, Miles JM. Measurement of non-steady-state free fatty acid turnover. *Am J Physiol.* 1990 ;258(1 Pt 1):E103-108.
117. Miles JM, Jensen MD. Determination of plasma-free fatty acid kinetics with tracers: methodologic considerations. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 1991;15(3):90S-93S.
118. Heiling VJ, Miles JM, Jensen MD. How valid are isotopic measurements of fatty acid oxidation? *Am J Physiol.* 1991;261(5 Pt 1):E572-577.
119. Riemens SC, Dullaart RP, Franssen EJ, et al. Measurement of free fatty acid kinetics during non-equilibrium tracer conditions in man: implications for the estimation of the rate of appearance of free fatty acids. *Eur J Clin Invest.* 1998;28(2):108-114.
120. Patterson BW, Zhao G, Elias N, et al Validation of a new procedure to determine plasma fatty acid concentration and isotopic enrichment. *J Lipid Res.* 1999; 40(11):2118-2124
121. Mittendorfer B, Liem O, Patterson BW, et al. What does the measurement of whole-body fatty acid rate of appearance in plasma by using a fatty acid tracer really mean? *Diabetes.* 2003 ;52(7):1641-1648
122. Richieri GV, Kleinfeld AM. Unbound free fatty acid levels in human serum. *J Lipid Res.* 1995 ;36(2):229-240
123. Chmurzyńska A. The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism. *J Appl Genet.* 2006; 47(1):39-48.
124. Storch J, Corsico B The Emerging Functions and Mechanisms of Mammalian Fatty Acid-Binding Proteins. *Annu Rev Nutr.* 2008 Apr 24
125. Richieri GV, Ogata RT, Kleinfeld AM. A fluorescently labeled intestinal fatty acid binding protein. Interactions with fatty acids and its use in monitoring free fatty acids. *J Biol Chem.* 1992; 267(33):23495-23501.
126. Richieri GV, Kleinfeld AM. Unbound free fatty acid levels in human serum. *J Lipid Res.* 1995 ;36(2):229-240
127. Richieri GV, Ogata RT, Kleinfeld AM. The measurement of free fatty acid concentration with the fluorescent probe ADIFAB: a practical guide for the use of the ADIFAB probe. *Mol Cell Biochem.* 1999;192(1-2):87-94
128. Simard JR, Kamp F, Hamilton JA. Acrylodan-labeled intestinal fatty acid-binding protein to measure concentrations of unbound fatty acids. *Methods Mol Biol.* 2007;400:27-43
129. Huber AH, Kampf JP, Kwan T, et al. Fatty acid-specific fluorescent probes and their use in resolving mixtures of unbound free fatty acids in equilibrium with albumin. *Biochemistry.* 2006 ;45(48):14263-14274

130. Shimizu, S., Inoue, R., Tani, Y., Yamada H. Enzymatic determination of serum free fatty acids. Anal. Biochem. 1979, 98 (2): 341-345.
131. Okabe H, Uji Y, Nagashima K, Noma A. Enzymic determination of free fatty acids in serum. Clin Chem. 1980; 26(11):1540-1543.
132. Hosaka K, Kikuchi T, Mitsuhida N, Kawaguchi A. A new colorimetric method for the determination of free fatty acids with acyl-CoA synthetase and acyl-CoA oxidase. J Biochem. 1981; 89(6):1799-1803
133. Kather H, Wieland E. Bioluminescent determination of free fatty acids. Anal Biochem. 1984 ;140(2):349-353
134. Jebens E, Sejersted OM. Enzymatic microdetermination of plasma and serum free fatty acids. Scand J Clin Lab Invest. 1992;52(7):717-724
135. Kiziltunc A, Akcay F. An enzymatic method for the determination of free fatty acids in serum/plasma. Clin Chem Lab Med 1998;36: 83-86.

Free Fatty Acids: the New Marker of Insulin Resistance and Ischemia.

Velkov V.V.,
DIAKON Ltd, Prospect Nauki 5, Pushchino, Moscow region, 142290, Russia.

The review of the publications dealing with the current achievements in the field of usage of the measurement of Free Fatty Acids (FFA) concentration in blood for the risk assessment and diagnostics of metabolic syndrome (MS), insulin resistance (IR), non insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM), cardiovascular diseases (CVD) and for the monitoring of therapy of the said pathologies. The special attention is given to the review of mechanisms leading to the lypotoxicity of high FFA levels for pancreatic beta cells and cardiotoxicity for myocardium and to the obesity caused mechanisms, inducing IR, NIDDM, CVD and diabetic cardiomyopathy.

В печати, 2008.