

СОСТАВ РЫБЬЕГО ЖИРА, СОЕВОГО И ЛЬНЯНОГО МАСЛА И ИХ ВЛИЯНИЕ В ФОРМИРОВАНИИ КОСТНОЙ ТКАНИ

COMPOSITION OF FISH OIL, SOYBEAN OIL AND FLAXSEED OIL AND THEIR EFFECTS ON THE FORMATION OF BONE TISSUE

*Elbahnasawy Amr Samir
E. Valeeva*

Summary. In our study, it was found that the composition of linseed oil is represented by α -linolenic acid (ALA) ω -3 PUFA, monounsaturated oleic acid. In addition, the main fatty acid contained in soybean oil was ω -6-PUFA (linoleic acid). Adding dietary oils containing omega-3 fatty acids, such as fish oil, soybean oil, and linseed oil, can reduce the effect of prednisolone on rat osteoporosis. The aim of the study was to study the composition of fish oil, soybean and linseed oil, their effect on the formation of bone tissue.

Keywords: fish oil; soybean and linseed oil; prednisone; bone tissue; rats.

Элбахнасави Амр Самир

Аспирант, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Россия, г. Казань
amrsamir84@yahoo.com

Валеева Эмилия Рамзиевна

Д.м.н., профессор, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Россия, г. Казань
val_med@mail.ru

Аннотация. В нашем исследовании установлено, что состав льняного масла представлен α -линоленовой кислотой (ALA) ω -3 ПНЖК, мононенасыщенной олеиновой кислотой. Кроме того, основной жирной кислоты, содержащейся в соевом масле, была ω -6-ПНЖК (линолевая кислота). Добавление в корм диетических масел, содержащих олеиненасыщенные жирные кислоты омега-3, таких как рыбий жир, соевое масло и льняное масло, может снизить эффект преднизолона в развитии остеопороза у крыс. Целью исследования явилось изучение состава рыбьего жира, соевого и льняного масла, их влияние на формировании костной ткани.

Ключевые слова: рыбий жир; соевое и льняное масло; преднизолон; костная ткань; крысы.

Введение

Овощная соя (*Glycine max* (L.) Merr.), травянистое растение из семейства Fabaceae (бобовые). Это самая важная бобовая культура в мире и наиболее широко распространенная масличная культура, выращиваемая в различных климатических условиях во всем мире.

Существует несколько групп питательных веществ в соевых бобах, которые в настоящее время исследуются на предмет полезного воздействия на здоровье, такие как флавоноиды и изофлавоноиды, фенольные кислоты, фитоалексины, фитостеролы, белки и пептиды и сапонины. El Wakf et al., [1] обнаружено, что прием пищи, дополненной соевым маслом, может быть полезен для защиты от потери костной массы, вызванного дефицитом эстрогенов в статусе овариэктомии, что видно из улучшения минеральной плотности костей.

Семя льна (*Linum usitatissimum* L.) является членом семейства Linaceae. Льняное масло широко потребля-

ется и стало объектом клинических исследований благодаря его функциональным свойствам. Льняное масло содержит большое количество биологически активных соединений, которые оказывают гиполипидемическое и антиоксидантное действие [2].

На рыбий жир приходится около 2% мирового потребления жиров и масел. Высокий уровень питательных ценных длинноцепочечных полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), в основном эйкозапентаеновой кислоты (EPA) и докозагексаеновой кислоты (DHA), наряду с их физико-химическими свойствами, делает рыбные липиды уникальными и перспективным экономически ценным продуктом. Хотя текущая ситуация с производством рыбьего жира стабильна, будущие прогнозы показывают, что имеющиеся дикие морские ресурсы становятся все более ограниченными, в то время как спрос на использование рыбьего жира продолжает расти во многих областях, таких как кормление животных, функциональные продукты питания и напитки, диетические добавки и фармацевтические препараты [3]. Cao et al., [4] сообщили, что увеличение содержания рыбьего жира в рационе

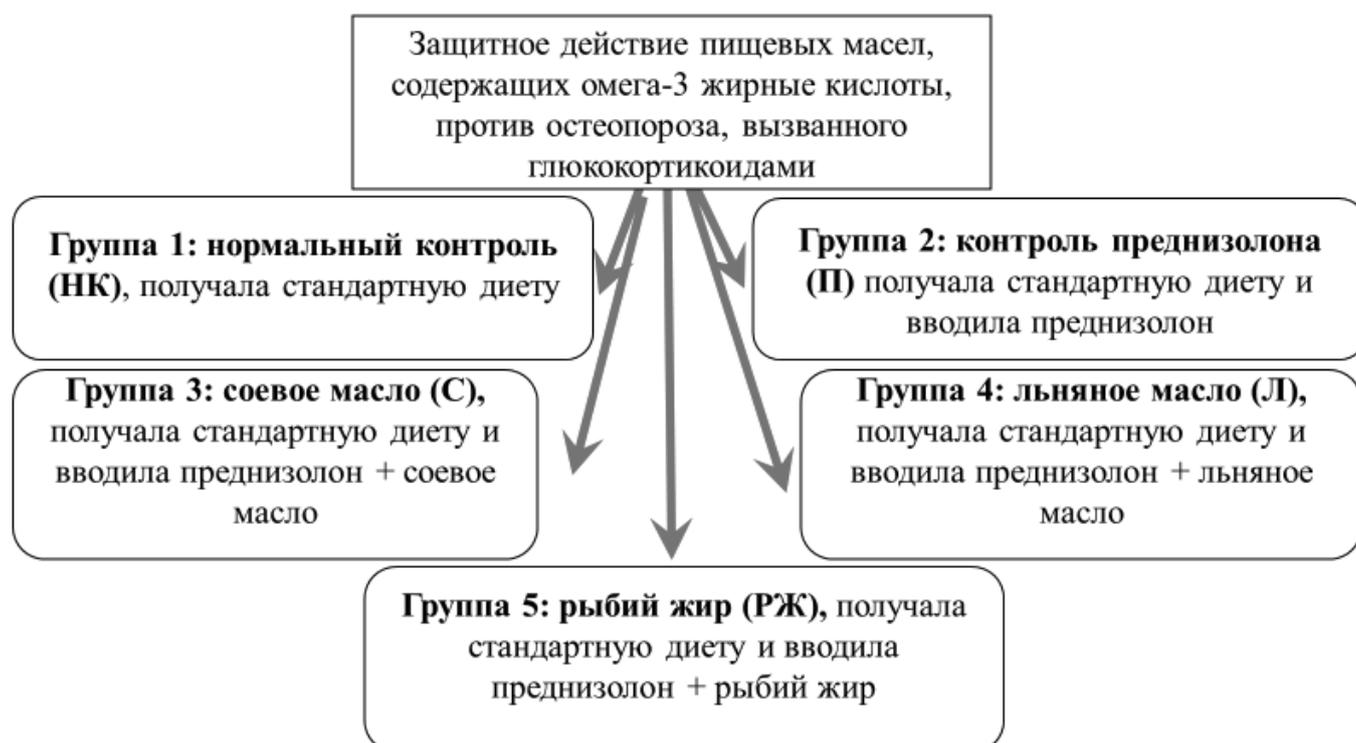


Рис. 1. Эксперимент с преднизолоном

снижает ожирение, воспаление жировой ткани и резорпцию кости и увеличивает костную массу у мышей.

Целью исследования явилось изучение состава рыбьего жира, соевого и льняного масла, их влияние на формировании костной ткани.

1. Материалы и методы

Рыбий жир (из печени трески) был получен от Тульского фармацевтического завода, г. Тула, Российская Федерация. Соевые и льняные масла были приобретены в Научно-исследовательском институте пищевых технологий, Сельскохозяйственный исследовательский центр, Гиза, Египет. Образцы масла хранили при -20°C в темных стеклянных бутылках до использования.

Изучение и анализ жирных кислот (ЖК) масел. Образцы масла были этерифицированы и метилированы в соответствии с официальным методом AOCS Ce 2-66 [5]. Метилловые эфиры ЖК были определены методом газовой хроматографии с использованием прибора фирмы Perkin Elmer Auto System XL, поставляемой с детектором ионизации пламени. Соединения разделяли на капиллярной колонке из плавленного кварца DB-Wax (внутренний диаметр 60 x 0,32 мм, толщина пленки 0,20 мкм). Температуру печи вначале поддерживали

на уровне 50°C в течение 5 минут, затем запрограммировали на повышение от 50 до 220°C со скоростью $4^{\circ}\text{C} / \text{мин}$. Скорости потока газа-носителя — гелия соответствовала 1,1 мл / мин. Температуры инжектора и детектора составляли 220 и 250°C соответственно. ФА были идентифицированы путем сравнения времен удерживания чистых стандартных метиловых эфиров ФА с отдельными компонентами образцов, которые были количественно определены с помощью нормализации площади (%) [6]. В качестве стандарта использовали смесь, состоящую из 37 метиловых эфиров ЖК (Supelco, Sigma-Aldrich Co. LLC, Германия) с чистотой от 99,1 до 99,9%.

Эксперимент на крысах животные были разделены на 5 групп (10 крыс на группу) следующим образом (Рис. 1): фактор некроза опухоли-альфа (ФНО- α). определяли по методу (ELISA) с помощью RayBio® Rat ФНО- α (RayBiotech, Inc., Норкросс, Джорджия, США). Малонового диальдегида (МДА), определяли по методу Draper and Hadley [7], основанному на реакции MDA с тиобарбитуровой кислотой (ТБА).

Гистопатологическое исследование включало в себя следующее: бедренные кости помещали в 10% формалин в физиологическом растворе на 48 часов, затем начинали декальцинацию этилендиаминтетрауксусной кислотой (EDTA) 10% через 7–7,4 ч в течение

Таблица 1. Жирно-кислотный профиль рыбьего жира, льняного масла и соевого масла

Жирные кислоты	Концентрация (%) от общего количества жирных кислот		
	Рыбий жир	Льняное масло	Соевое масло
Насыщенные жирные кислоты (НЖК)			
Миристический C14: 0	5,19	НО	НО
Пальмитиновая кислота C16: 0	8,17	8,80	12,19
Стеариновая кислота C18: 0	2,05	5,79	4,22
Арахидовая кислота C20: 0	НО	0,26	0,37
Бегеновая кислота, C22: 0	НО	НО	0,13
Всего НЖК	15,41	14,85	16,91
Мононенасыщенные жирные кислоты (МНЖК)			
Пальмитолеиновая кислота, C16: 1n7	6,39	НО	НО
Олеиновая кислота, C18: 1n9	12,21	21,40	24,35
Вакценовая кислота, C18: 1n7	4,14	НО	НО
Эйкозеновая кислота C20: 1n9	8,35	НО	НО
Цетолеиновая кислота, C22: 1n11	5,19	НО	НО
Всего МНЖК	36,28	21,40	24,35
Полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК)			
Линолевая кислота, C18: 2n6	1,5	22,47	53,58
α -Линоленовая кислота (ALA) C18: 3n3	0,74	40,29	4,67
Стеаридоновая кислота C18: 4n3	3,6	НО	НО
Арахидоновая кислота, C20: 4n6	0,25	НО	НО
Эйкозопентаеновая кислота (EPA) C20: 5n3	19,12	НО	НО
Докозопентаеновая кислота, (DPA) C22: 5n3	1,9	НО	НО
Докозагексаеновая кислота (DHA) C22: 6n3	21,08	НО	НО
Всего ω -6 полиненасыщенных жирных кислот	1,75	22,47	53,58
Всего ω -3 полиненасыщенных жирных кислот	46,44	40,29	4,67
Всего ПНЖК	48,19	62,76	58,25

НО (не обнаружено).

4 недель, Очищенные фиксированные ткани помещали в парафин, образуя блоки из твердого парафина с тканями в его центрах, каждый блок из твердого парафина разрезали на тонкие срезы (толщиной 6 микрометров). Предметные стекла окрашивали гематоксилином и эозином (H & E). Окрашенные срезы исследовали гистологически и фотографировали. Изображения анализировали с помощью Optima (Media Cybernetics, 1998 г., версия 6.21.19) и с помощью светового микроскопа [8].

Данные были статистически проанализированы в операционной системе Windows 10 с использованием стандартной прикладной программы «Microsoft Word», статистической программы CoStat Version 6.451 (CoHort Software, США), электронных таблиц «Excel 2016», с использованием пакета ATTESTAT.

2. Результаты

Анализ и состав рыбьего жира, соевого масла, льняного масла

Профиль жирных кислот рыбьего, льняного и соевого масел представлен в таблице 1. Процентное содержание общих насыщенных жирных кислот (SFA) в соевом масле было немного выше, чем у рыбьего жира и льняного масла, основной насыщенной жирной кислотой, обнаруженной в трех маслах, была пальмитиновая кислота C16: 0. Можно также отметить, что рыбий жир содержал множество мононенасыщенных жирных кислот (MUFA), которые показали наибольшее значение по сравнению с соевым и льняным маслами, которые имели высокое содержание олеиновой кислоты C18: 1n9. Рыбий жир содержал высокие уровни длинноцепочечных ω -3 поли-

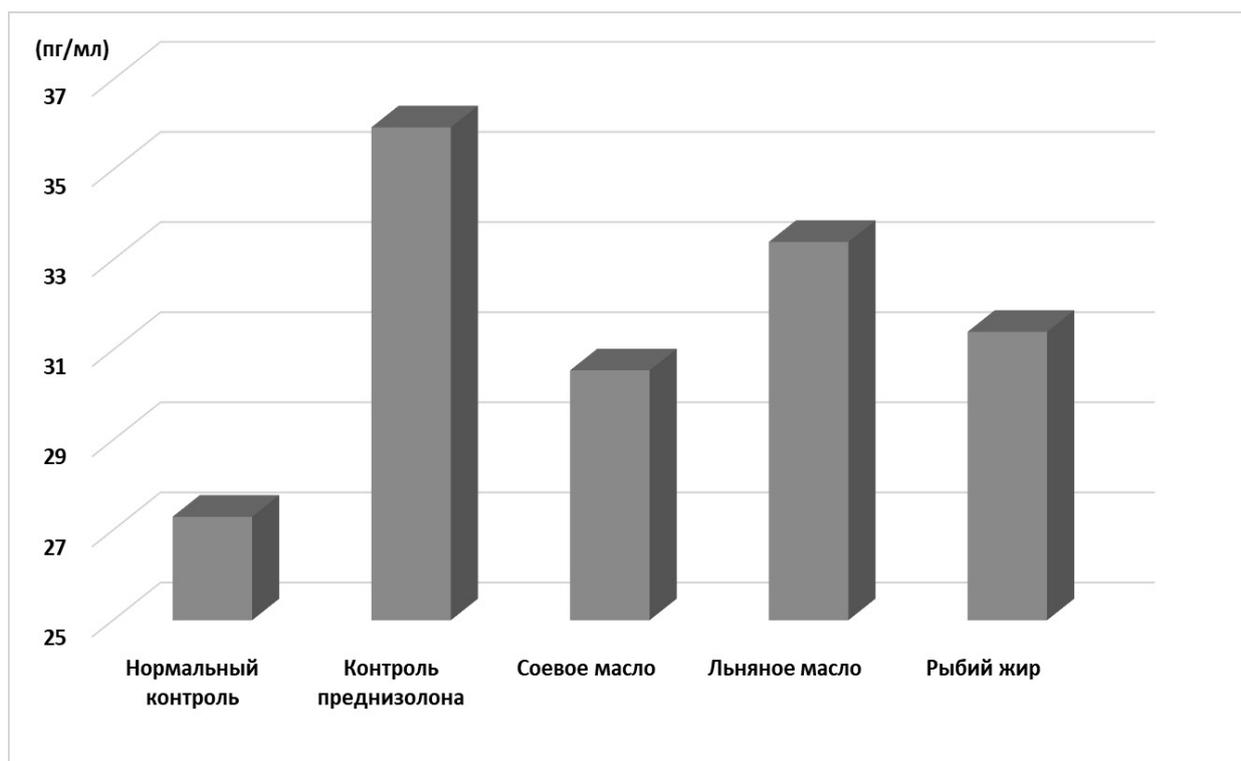


Рис. 2. Уровни ФНО-α

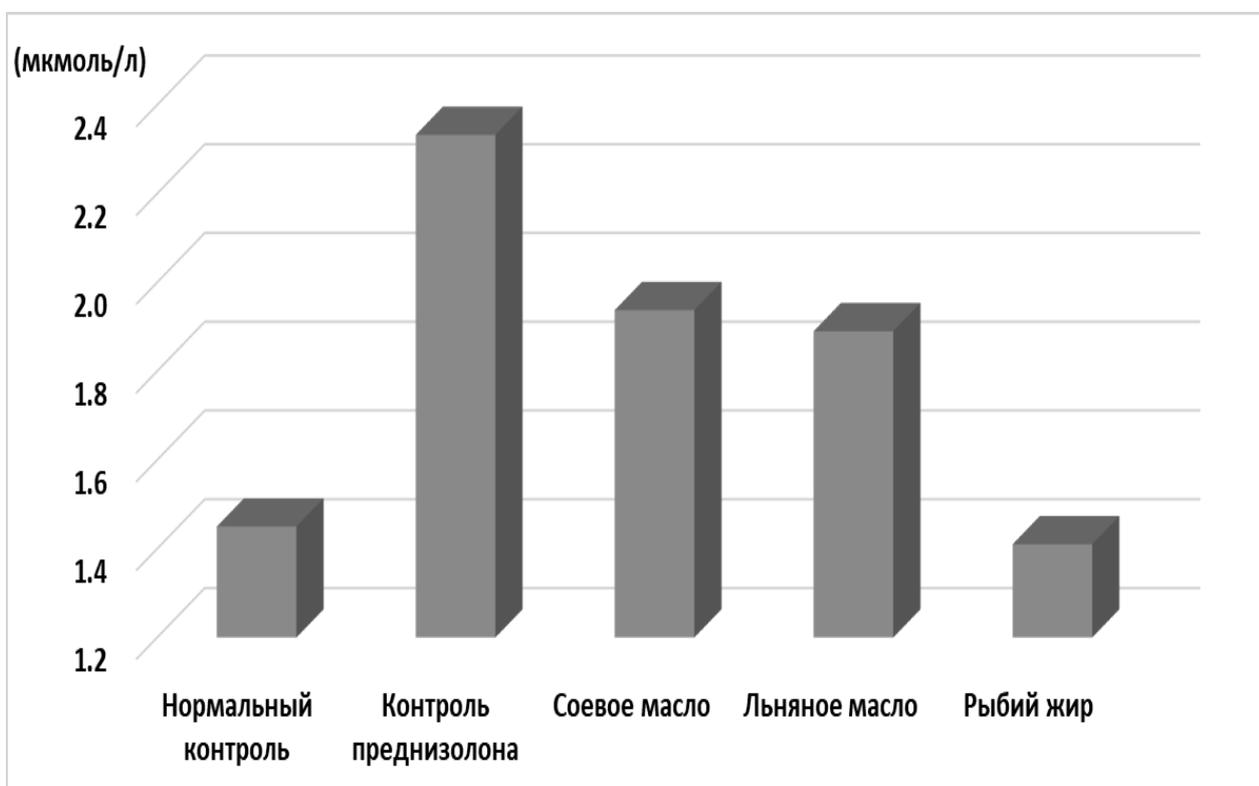


Рис. 3. Уровни МДА

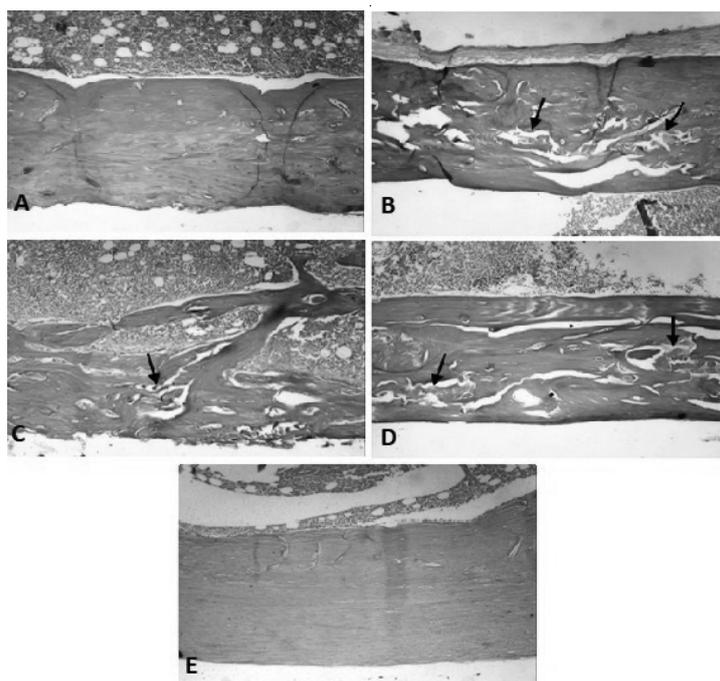


Рис. 4.(А) Микрофотография кости крысы из контрольной группы без гистопатологических изменений, нормальной толщины кортикальной кости и остеоцита; (В) микрофотография кости крысы группы с преднизолоном, показывающая несколько полостей резорбции в матрице, аномальный остеоцит, тонкую кортикальную кость с наличием трещин; (С) микрофотография кости крысы из группы соевого масла, показывающая небольшое количество трещин в кортикальной кости; (D) микрофотография кости крысы из группы льняного масла, показывающая очаговый некроз с небольшим количеством трещин в кортикальной кости; (E) Микрофотография кости крысы из группы рыбьего жира без гистопатологических изменений, нормальной кости и остеоцита (H & E X 100).

ненасыщенных жирных кислот, эйкозапентаеновой кислоты (EPA) C20: 5n3 и докозагексаеновой кислоты (DHA) C22: 6n3, в то время как соевое масло содержало наибольшее количество ω -6 полиненасыщенных жирных кислот (Линолевая кислота) C18: 2n6. С другой стороны, основными полиненасыщенными жирными кислотами, обнаруженными в льняном масле, была α -линоленовая кислота (ALA) C18: 3n3. Как видно из результатов этого исследования, состав жирных кислот соевого масла, льняного масла и рыбьего жира отличается друг от друга и имеет множество различных жирных кислот, поэтому необходимо было оценить, какое масло является более эффективным в метаболизме костей и в профилактике остеопороза.

Биомаркеры, связанные с воспалением и окислительным стрессом

Группа с преднизолоном зафиксировала самые высокие значения маркеров воспалительного и окислительного стресса ФНО- α и МДА соответственно, в то время как контрольная группа зафиксировала самые низкие значения (рис. 2,3). С другой стороны, введение масел

значительно улучшило эти показатели в группах, особенно рыбьего жира, который продемонстрировал нормальное значение МДА по сравнению с контрольной группой.

Результаты гистологических исследований бедренной кости на фоне использования рыбьего жира, соевого масла, льняного масла

Результаты гистологических исследований бедренной кости показали, что контрольная группа (рис. 4А) и группа рыбьего жира (рис. 4Е) имели нормальную толщину кортикальной кости и остеоцит без гистопатологических изменений. В противоположность этому, в группе преднизолона (рис. 4В) четко показана тонкая кортикальная кость с наличием трещин, аномальных остеоцитов и нескольких полостей резорбции внутри матрикса. С другой стороны, только несколько трещин в кортикальной кости были замечены в группе соевого масла (рис. 4С), в то время как был некоторый очаговый некроз с небольшим количеством трещин в кортикальной кости крыс из группы льняного масла (рис. 4D).

3. Обсуждение

в нашем исследовании установлено, что состав жирной кислоты льняного масла представлен α -линоленовой кислотой (ALA) ω -3 ПНЖК, мононенасыщенной олеиновой кислотой.

Кроме того, основной жирной кислоты, содержащейся в соевом масле, была ω -6-ПНЖК (линолевая кислота). Этот результат был аналогичен работе Dorni et al., [9] которые обнаружили, что анализ жирных кислот соевого масла показал, что полиненасыщенная линолевая кислота ω -6 была самой высокой (более 50%), за ней следовали мононенасыщенная олеиновая кислота, а затем насыщенная пальмитиновая кислота, составляющая почти более 90% всех жирных кислот. С другой стороны, известно, что подсолнечное масло богато линолевой и олеиновой кислотами. Сообщалось, что рыбий жир является хорошим источником длинноцепочечных ω -3 ПНЖК со значительными количествами EPA и DHA, которые считаются метаболически активными соединениями [10].

Глюкокортикоиды (ГК) поглощаются через клеточную мембрану специальными рецепторами и влияют на метаболизм липидов, белков и углеводов. Воздействие ГК на кость может быть связано с дисбалансом между резорбцией кости и ремоделированием кости [11].

МДА является вторичным веществом перекисного окисления липидов, которое тесно связано с окислительным стрессом. По нашим данным, лечение маслами значительно снижало окислительный стресс во всех группах. Han, Parker [12] обнаружили, что добавление льняного масла значительно снижало уровни МДА в сыворотке и печени и подавляло печеночный окислительный стресс. Сообщалось об иммунологическом действии соевого масла и его влиянии на улучшение провоспалительного статуса и окислительного стресса. Согласно данным, полученным Muga, Chao [13], обработка рыбьим жиром снижала уровень перекисного окисления липидов до уровня, равного или ниже контрольного уровня, и это может предотвращать или лечить перекисное окисление липидов. Piringas et al., [14] изучали влияние рыбьего жира на здоровье у 160 здоровых людей, и исследование показало, что ежедневное потребление рыбьего жира предотвращает окислительный стресс. Остеоциты могут модулировать образование и функцию, как остеобластов, так и остеокластов. Апоптотические остеоциты высвобождают некоторые провоспалительные цитокины, такие как ФНО- α , чтобы стимулировать остеокластогенез.

Воздействие ГК может привести к апоптозу остеоцитов, вызывающему потерю костной массы. Наши данные

показали, что в группе преднизолона зафиксированы высокие значения маркера воспаления ФНО- α . Апоптотические остеоциты, которые индуцируются после введения с помощью GC, могут усиливать образование ФНО- α . Согласно результатам наших исследований, лечение маслами, богатыми ПНЖК, уменьшило воспаление. Недавние исследования показали, что прием ПНЖК эффективно снижает маркеры воспаления. Muga, Chao [13] сообщили, что лечение рыбьим жиром регулирует воспаление путем снижения концентрации ФНО- α .

Наше гистологическое исследование костей показало, что преднизолон воздействовал на кости на клеточном уровне и вызывал многие нарушения в коре и остеонитах, в то время как введение масел, особенно рыбьего жира, уменьшало большинство этих побочных эффектов преднизолона. Согласно Kasem et al., [15], гистологическое исследование бедренной кости крысы после введения преднизолона для индукции остеопороза показало значительное уменьшение толщины коры и количества остеоцитов в группе остеопороза по сравнению с контрольной группой. Derakhshanian et al., [16] зафиксировали уменьшение толщины коры и трабекулы, а также значительное уменьшение количества остеобластов у крыс, получавших глюкокортикоиды. ПНЖК могут подавлять действие остеокластов и усиливать активность остеобластов. Таким образом, резорбция кости ингибируется и стимулируется формирование кости. При добавлении рыбьего жира улучшается МПК, механические и гистологические характеристики костей.

Заключение

Результаты наших исследований показали, что в группе преднизолона зафиксированы высокие значения маркера воспаления ФНО- α . Апоптотические остеоциты, которые индуцируются после введения с помощью GC, могут усиливать образование ФНО- α .

Добавление в корм диетических масел, содержащих полиненасыщенные жирные кислоты омега-3, таких как рыбий жир, соевое масло и льняное масло, может снизить эффект преднизолона в развитии остеопороза у крыс. Таким образом, изученные масла (соевое, льняное масла и рыбий жир), в частности, могут быть использованы в качестве естественных добавок для предотвращения потери костной массы.

Благодарности

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

ЛИТЕРАТУРА

1. El Wakf A. M. Osteoprotective effect of soybean and sesame oils in ovariectomized rats via estrogen-like mechanism / A. M. El Wakf, H. A. Hassan, N. S. Gharib // *Cytotechnology* — 2014. — Vol. 66 — N. 2 — P. 335–343.
2. Jamilian M. The effects of omega-3 fatty acids from flaxseed oil on genetic and metabolic profiles in patients with gestational diabetes mellitus: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial / M. Jamilian, Z. Tabassi, Ž. Reiner, I. Panahandeh, F. Naderi, E. Aghadavood, E. Amirani, M. Taghizadeh, R. Shafabakhsh, M. Satari // *Br. J. Nutr.* — 2020. — P. 1–26.
3. Ivanovs K. Extraction of fish oil using green extraction methods: A short review / K. Ivanovs, D. Blumberga // *Energy Procedia* — 2017. — Vol. 128 — P. 477–483.
4. Cao J. J. Increasing Dietary Fish Oil Reduces Adiposity and Mitigates Bone Deterioration in Growing C57BL/6 Mice Fed a High-Fat Diet / J. J. Cao, B. R. Gregoire, K. G. Michelsen, M. J. Picklo // *J. Nutr.* — 2020. — Vol. 150 — N. 1 — P. 99–107.
5. AOCS. 2009. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society, AOCS, Champaign, IL.
6. Veronezi C. M. Basil (*Ocimum Basilicum* L.) as a Natural Antioxidant / C. M. Veronezi, T. Costa, N. Jorge // *J. Food Process. Preserv.* — 2014. — Vol. 38 — N. 1 — P. 255–261.
7. Draper H. H. Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation / H. H. Draper, M. Hadley // *In Methods in enzymology.* — 1990 Vol. 186 — P. 421–431.
8. Kim T. ATP6v0d2 deficiency increases bone mass, but does not influence ovariectomy-induced bone loss / T. Kim, H. Ha, N. Kim, E.-S. Park, J. Rho, E. C. Kim, J. Lorenzo, Y. Choi, S. H. Lee // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2010. — Vol. 403 — N. 1 — P. 73–78.
9. Dorni C. Fatty acid profile of edible oils and fats consumed in India / C. Dorni, P. Sharma, G. Saikia, T. Longvah // *Food Chem.* — 2018. — Vol. 238 — P. 9–15.
10. Calder P. C. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: effects, mechanisms and clinical relevance / P. C. Calder // *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Molecular Cell Biol. Lipids* — 2015. — Vol. 1851 — N. 4 — P. 469–484.
11. Lane N. E. Glucocorticoid-induced osteoporosis: new insights into the pathophysiology and treatments / N. E. Lane // *Curr. Osteoporos. Rep.* — 2019. — Vol. 17 — N. 1 — P. 1–7.
12. Han X. Essential oils diversely modulate genome-wide gene expression in human dermal fibroblasts / X. Han, T. L. Parker // *Cogent Med.* — 2017. — Vol. 4 — N. 1 — P. 1307591.
13. Muga M. A. Effects of fish oil and spirulina on oxidative stress and inflammation in hypercholesterolemic hamsters / M. A. Muga, J. C. J. Chao // *BMC Complement. Altern. Med.* — 2014. — Vol. 14 — N. 1 — P. 470.
14. Pipingas A. Fish oil and multivitamin supplementation reduces oxidative stress but not inflammation in healthy older adults: a randomised controlled trial / A. Pipingas, A. Sinclair, K. D. Croft, A. S. Januszewski, A. J. Jenkins, T. A. Mori, R. Cockerell, N. A. Grima, C. Stough, A. Scholey // *J. Funct. Foods* — 2015. — Vol. 19 — P. 949–957.
15. Kasem M. A. Histological effect of bisphosphonate, vitamin D and olive oil on glucocorticoid induced osteoporosis (Gio) in Albino Rat / M. A. Kasem, A. M. Abdel-Aleem, A. S. Said, E.-S. G. Khedr // *Egypt. J. Hosp. Med.* — 2016. — Vol. 65 — N. 1 — P. 699–708.
16. Derakhshanian H. Quercetin prevents experimental glucocorticoid-induced osteoporosis: a comparative study with alendronate / H. Derakhshanian, M. Djalali, A. Djazayery, K. Nourijelyani, S. Ghadbeigi, H. Pishva, A. Saedisomeolia, A. Bahremand, A. R. Dehpour // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* — 2013. — Vol. 91 — N. 5 — P. 380–385.

© Элбахнасави Амр Самир (amrsamir84@yahoo.com), Валеева Эмилия Рамзиевна (val_med@mail.ru).

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»