

DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-182-10-46-55

УДК 616.34, 612.397.2

Возможности использования жирных кислот мембран эритроцитов и сыворотки крови для диагностики болезни Крона

Кручинина М.В.^{1,2}, Азгалдян А.В.¹, Светлова И.О.², Осипенко М.Ф.², Шашков М.В.³, Соколова А.С.⁴, Кручинин В.Н.⁵¹ Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины — филиал ФГБНУ ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, 630089, г. Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, 175/1² ФГБОУ ВО Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Новосибирск, Российская Федерация, 630091, г. Новосибирск, Красный проспект, 52³ ФГБНУ Институт катализа им. Г.К. Борескова СО РАН, 630090, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 5⁴ ФГБНУ Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, 630090, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 9⁵ ФГБНУ Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова СО РАН, 630090, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 13

Opportunities for the use of fatty acids of erythrocytes membranes and blood serum for diagnosis of Crown's disease

M.V. Kruchinina^{1,2}, A.V. Azgaldyan¹, I.O. Svetlova², M.F. Osipenko², M.V. Shashkov³, A.S. Sokolova⁴, V.N. Kruchinin⁵¹ Research Institute of Internal and Preventive Medicine — Branch of the Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, 630089, Novosibirsk, st. Boris Bogatkov, 175/1² Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "Novosibirsk State Medical University" Ministry of Health of the Russian Federation, 630091, Novosibirsk, Krasnyj prospect, 52³ Borekov Institute of Catalysis SB RAS, 630090, Novosibirsk, Lavrentiev Ave. 5⁴ Novosibirsk Institute of Organic Chemistry SB RAS, 630090, Novosibirsk, Lavrentiev Ave. 9⁵ Rzhanov Institute of Semiconductor Physics SB RAS, 630090, Novosibirsk, Lavrentiev Ave. 13

Для цитирования: Кручинина М. В., Азгалдян А. В., Светлова И. О., Осипенко М. Ф., Шашков М. В., Соколова А. С., Кручинин В. Н. Возможности использования жирных кислот мембран эритроцитов и сыворотки крови для диагностики болезни Крона. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2020;182(10): 46–55. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-182-10-46-55

For citation: Kruchinina M. V., Azgaldyan A. V., Svetlova I. O., Osipenko M. F., Shashkov M. V., Sokolova A. S., Kruchinin V. N. Opportunities for the use of fatty acids of erythrocytes membranes and blood serum for diagnosis of Crown's disease. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2020;182(10): 46–55. (In Russ.) DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-182-10-46-55

✉ *Corresponding author:*

Кручинина
Маргарита Витальевна
Margarita V. Kruchinina
kruchmargo@yandex.ru

Кручинина Маргарита Витальевна, Лаборатория гастроэнтерологии, ведущий научный сотрудник, д.м.н.; доцент кафедры пропедевтики внутренних болезней

Азгалдян Александра Викторовна, аспирант лаборатория гастроэнтерологии

Светлова Ирина Олеговна, доцент кафедры терапии, гематологии и трансфузиологии (факультета повышения квалификации и переподготовки врачей), к.м.н.

Осипенко Марина Федоровна, заведующая кафедрой пропедевтики внутренних болезней, д.м.н., профессор

Шашков Михаил Вадимович, Аналитическая лаборатория, научный сотрудник, кандидат химических наук

Соколова Анастасия Сергеевна, Лаборатория физиологически активных веществ, научный сотрудник, кандидат химических наук

Кручинин Владимир Николаевич, научный сотрудник, кандидат химических наук

Margarita V. Kruchinina, Laboratory of Gastroenterology, Leading researcher, MD; Department of Propaedeutics of Internal Medicine, Associate Professor

Alexandra V. Azgaldyan, Laboratory of Gastroenterology, Post Graduate Student

Irina O. Svetlova, Department of Therapy, Hematology and Transfusiology (Faculty of Continuing Education and Retraining of Doctors), PhD

Marina F. Osipenko, Head of the Department of Propaedeutics of Internal Medicine, MD, Professor

Mikhail V. Shashkov, Researcher, PhD

Anastasia S. Sokolova, Researcher, PhD

Vladimir N. Kruchinin, Researcher, PhD

Резюме

Цель работы. Исследовать особенности жирнокислотного (ЖК) состава мембран эритроцитов (Эр) и сыворотки крови (СК) у пациентов с болезнью Крона (БК) для возможного использования в целях дифференциальной диагностики.

Материалы и методы. С помощью хромато-масс-спектрометрической системы (ГХ/МС) на основе трех квадруполов Agilent 7000B (США) исследован состав ЖК эритроцитов (Эр) и сыворотки крови (СК) 60-ти человек: 19 — с болезнью Крона (БК, $34 \pm 6,2$ года), 21 — с неклассифицируемыми колитами (НKK, $35,2 \pm 4,7$ года) и 20 здоровых лиц ($32,9 \pm 5,7$ года).

Результаты. Установлено, что уровни большей части насыщенных, моновенасыщенных омега-9, омега-6 ПНЖК оказались достоверно выше, а содержание преобладающей части омега-3, ряда омега-6 (линолевой, эйкозодиеновой, арахидоновой) — ниже, чем у здоровых лиц. Относительное содержание ЖК у больных с НKK оказалось промежуточным между таковыми у больных с БК и здоровыми ($p < 0,0001 - 0,02$).

Полученные дифференцирующие значения уровней ЖК и их индексов в мембранах эритроцитов позволили выявить пациентов с предполагаемой болезнью Крона из тех, у кого диагностирован неклассифицируемый колит, что свидетельствует о высоком потенциале данного подхода для целей дифференциальной диагностики.

Заключение. Созданные диагностические панели (ЖК сыворотки крови и мембран эритроцитов) позволили дифференцировать пациентов с БК от здоровых лиц с достаточно высокими уровнями чувствительности и специфичности. Выявленные особенности уровней ЖК мембран Эр и СК, а также их соотношения у пациентов с БК перспективны для целей дифференциальной диагностики, в том числе, в случаях НKK.

Ключевые слова: болезнь Крона, неклассифицируемые колиты, дифференциальная диагностика, хромато-масс-спектрометрия, жирные кислоты, эритроциты, сыворотка крови

Summary

Aim of work is to study the features of the fatty acid (FA) composition of the membranes of erythrocytes (Er) and blood serum (BS) in patients with Crohn's disease (CD) for possible use for differential diagnosis.

Materials and methods. Using a gas chromatography-mass spectrometric system (GC/MS) based on three Agilent 7000B quadrupoles (USA), the composition of erythrocytes (Er) and blood serum (SC) of 60 people was studied: 19 — with Crohn's disease (CD, $34 \pm 6,2$ years), 21 — with unclassified colitis (UCC, $35,2 \pm 4,7$ years) and 20 healthy individuals ($32,9 \pm 5,7$ years).

Results. It was found that the levels of most saturated, monounsaturated omega-9, omega-6 PUFAs were significantly higher, and the content of the predominant part of omega-3, a number of omega-6 (linoleic, eicosadienoic, arachidonic) was lower than in healthy individuals. The relative content of FA in patients with unclassified colitis turned out to be intermediate between those in patients with CD and healthy ($p < 0,0001 - 0,02$).

The obtained differentiating values of FA levels and their indices in the erythrocyte membranes made it possible to identify patients with suspected Crohn's disease from those who were diagnosed with unclassified colitis, which indicates the high potential of this approach for differential diagnosis.

Conclusion. The created diagnostic panels (FA of blood serum and erythrocyte membranes) made it possible to differentiate patients with CD from healthy individuals with fairly high levels of sensitivity and specificity. The revealed features of the levels of FA membranes of Er and BS, as well as their ratio in patients with CD, are promising for the purposes of differential diagnosis, including in cases of unclassified colitis.

Keywords: Crohn's disease, unclassified colitis, differential diagnosis, chromatography-mass spectrometry, fatty acids, red blood cells, blood serum

Введение

Болезнь Крона является хроническим и прогрессирующим воспалительным заболеванием кишечника (ВЗК) с пиком заболеваемости в возрасте 15–30 лет [1, 2]. БК может поражать любую часть кишечной трубки от полости рта до перианальной области. При поражении тонкой кишки пациенты с БК могут иметь серьезные нутритивные осложнения. Этиология воспалительных заболеваний

кишечника не установлена. Однако, очевидно, что основу патогенеза этих нозологических форм составляет сочетание генетически детерминированных и приобретенных дефектов регуляторных механизмов, которые ограничивают патологическую активацию иммунной системы человека в ответ на потенциально патогенные и/или физиологические стимулы. Ранее предполагалось, что вклад мутаций

генов (регуляция процессов распознавания бактерий, аутофагия, дифференцировка лимфоцитов Th17) для развития БК составляет менее 25% [3], подразумеваемая, что другие факторы, такие как переменные среды и диетические антигены, играют важную роль в обострении БК [4–6]. В проведенных ранее исследованиях было показано, что жирнокислотный профиль мембран эритроцитов у пациентов с БК значительно отличается от такового у здоровых лиц и пациентов с язвенным колитом значительно меньшим процентным содержанием линолевой кислоты при БК [7]. Следовательно, ферменты, участвующие в метаболизме линолевой кислоты, например, дельта-6-десатуразы, считаются гиперактивированными у пациентов с БК. Выявлены более низкие уровни дигомо-γ-линоленовой кислоты (C20:3 n-6), соотношение суммы эйкозапентаеновой и докозапентаеновой жирных кислот к арахидоновой кислоте и более высокое содержание маргариновой (C17:0) и олеиновой (C18:1; c9) в мембранах эритроцитов пациентов с болезнью Крона в сравнении с больными с язвен-

ным колитом [8]. Существенные сдвиги в уровнях полиненасыщенных жирных кислот, в том числе, омега-3 и омега-6, связаны с их участием в перечне ключевых биологических процессов, включая физиологические процессы в клеточной мембране, эйкозаноидное продуцирование, воспаление, регуляцию и экспрессию генов [9]. Наличие существенных сдвигов в уровнях жирных кислот предполагает возможное их использование как биологических маркеров для диагностики БК. Тем более, что в 25% случаев клиницистам приходится прибегать к диагнозу «неклассифицируемый колит», который предполагает дальнейшую верификацию. С другой стороны, измененный жирнокислотный профиль – это возможный таргет для терапевтических воздействий, модификаций с помощью диеты.

Цель настоящего исследования – исследовать особенности жирнокислотного состава мембран эритроцитов и сыворотки крови у пациентов с болезнью Крона для возможного использования в целях дифференциальной диагностики.

Материалы и методы

В период с 2016 по 2019 гг. обследовано 19 пациентов – с БК (34,5±6,2 года), 21 – с неклассифицируемыми колитами (НKK) (35,2±4,7 года) и 20 здоровых лиц (32,9±5,7 года).

Клинико-инструментальная характеристика обследованных групп представлена в таблице 1. Группы пациентов с ВЗК были сопоставимы по возрасту, полу, индексу массы тела, числу курильщиков. Длительность заболевания у преобладающей части пациентов обеих групп оказалась более трех лет (в 73,7% случаев – у пациентов с БК и в 71,4% – у больных с НKK). У более половины пациентов в обеих группах с ВЗК отмечена средняя степень тяжести заболевания, оставшиеся больные имели легкое течение заболевания. У большей части пациентов обеих групп эндоскопическая активность соответствовала умеренной (в 63,2% случаев в группе с БК и в 61,9% – в группе с НKK). У преобладающей части пациентов с БК (68,4%) выявлены поражение подвздошной и толстой кишки, колит определен в 31,6% случаев. В группе с НKK, кроме илеоколита (38,1%) и колита (14,3%), отмечены пациенты с левосторонним колитом (28,6%) и проктитом/проктосигмоидитом (19%). На момент обследования у всех пациентов диагностирована клиническая ремиссия (индекс активности Беста – менее 150 баллов).

Группы пациентов оказались сопоставимы по уровню маркеров воспаления (достоверно отличаясь от группы сравнения по уровням фекального кальпротектина и С-реактивного белка, $p < 0,001$) и проводимой терапии. Достоверных различий по уровню гемоглобина, количеству лейкоцитов не выявлено. В качестве группы сравнения были отобраны пациенты, сопоставимые с основными группами по возрасту и полу без манифестирующей патологии внутренних органов. Пациенты группы сравнения исключались из исследования, если они получали какие-либо добавки омега-3

полиненасыщенных жирных кислот или статины, имели гиперлипидемию, которая могла потребовать лекарственной коррекции, какие-либо значительные отклонения по данным исследования общего анализа крови или биохимии или имели холестериновые камни в желчном пузыре, поскольку вышеописанные факторы оказывают существенное влияние на профиль жирных кислот сыворотки крови и мембран эритроцитов [10].

Исследование состава жирных кислот Эр и СК проведено с помощью ГХ/МС системы на основе трех квадруполой *Agilent 7000B* (США). Концентрации жирных кислот выражали в относительных процентах. Предел обнаружения жирной кислоты ~1 мкг на образец. Подробное описание пробоподготовки и процесса исследования состава жирных кислот приведено в работе [11]. Десатуразная активность определялась как соотношение уровней: [дигомо-γ-линоленовая ЖК + арахидоновая ЖК] / [линолевая ЖК] или $[C20:3n-6 + C20:4n-6 / C18:2n-6]$ как показатель, который отражает активность дельта-6-десатуразы; т.е. индекс дельта-десатурации. Оценивали соотношение пальмитиновой кислоты к линолевой $[C16:0 / C18:2n-6]$, отражающее активность элонгазы.

Для статистического анализа использовано программное обеспечение SPSS, ver. 22. Для сравнения между двумя независимыми группами применялись тесты Mann–Whitney U и/или хи-квадрат. Для сравнения параметров между тремя независимыми группами использован метод ANOVA с последующим тестом Tukey HSD. Ранговые коэффициенты корреляции Спирмена использовались для оценки корреляций между дискретными переменными. Во всех процедурах статистического анализа критический уровень значимости нулевой гипотезы (p) принимался равным 0,05. Оценка диагностической точности панелей показателей произведена с помощью ROC-анализа.

Параметры	Исследуемые группы		
	Группа сравнения (n=20)	Группа пациентов с болезнью Крона (n=19)	Группа пациентов с неклассифицируемыми колитами (НKK) (n=21)
Возраст, (лет)	32,9±5,7	34,5±6,2	35,2±4,7
Пол, чел. (мужчины / женщины)	10/10	10/9	10/11
Курение, (чел.,%)	2 (10%)	3 (15,7%)	3 (14,3%)
Индекс массы тела (кг/м ²)	21,9±2,4	20,9±3,1	20,1±3,9
Длительность заболевания, (годы)			
> 3	-	14 (73,7%)	15 (71,4%)
1–3	-	5 (26,3%)	6 (28,6%)
Степень тяжести			
легкая	-	9 (47,4%)	9 (42,9%)
средняя	-	10 (52,6%)	10 (57,1%)
Эндоскопическая активность			
минимальная	-	7 (36,8%)	8 (38,1%)
умеренная	-	12 (63,2%)	13 (61,9%)
Локализация			
проктит и проктосигмоидит	-	-	4 (19,0%)
левосторонний колит	-	-	6 (28,6%)
илеocolит	-	13 (68,4%)	8 (38,1%)
колит	-	6 (31,6%)	3 (14,3%)
Уровень гемоглобина, (г/л)	136,2±2,8	133,1±2,7	129,1±3,1
Количество лейкоцитов, (×10 ⁹ /л)	5,8±1,3	6,1±1,8	6,9±2,2
Фекальный кальпротектин (мг/г)	32,1±3,8	176,4±9,5**	183,5±11,9**
С-реактивный белок (мг/л)	1,1±0,9	5,1±3,1**	4,8±2,7**
Индекс активности БК (баллы)	-	127,8±91,3	135,5±88,9
Терапия			
аминосалицилаты	-	17 (89,5%)	16 (76,2%)
иммуномодуляторы	-	8 (42,1%)	5 (23,8%)

Таблица 1.

Клинико-инструментальная характеристика обследованных групп.

Примечания:

* – достоверность (p) отличия от группы сравнения;

* – p<0,05, ** – p<0,001

Исследование выполнено с одобрения Комитета Биомедицинской Этики Научно-исследовательского института терапии и профилактической медицины – филиала Федерального государственного бюджетного научного учреждения

«Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (17.12.2018, протокол № 120). Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Результаты

Анализ уровней жирных кислот в сыворотке крови пациентов с ВЗК позволил выявить разнонаправленные тенденции насыщенных и ненасыщенных ЖК у пациентов с болезнью Крона и неклассифицируемыми колитами в сравнении со здоровыми лицами, а также между группами больных с ВЗК (рисунок 1).

У пациентов с болезнью Крона уровни сыровоточных пальмитиновой (C16:0), пальмитолевой (C16:1n-9), олеиновой (C18:1n-9), γ-линоленовой (C18:3 n-6), дигомо-γ-линоленовой (C20:3 n-6) оказались достоверно выше, а стеариновой (C18:0), лигноцериновой (C24:0), гондоиновой (20:1n-9), эйкозапентаеновой (C20:5 n-3), докозапентаеновой (C22:5 n-3), докозагексаеновой (C22:6 n-3), линолевой (C18:2 n-6), эйкокадиеновой (C20:2 n-6) – достоверно ниже, чем в группе сравнения (p<0,05–0,001).

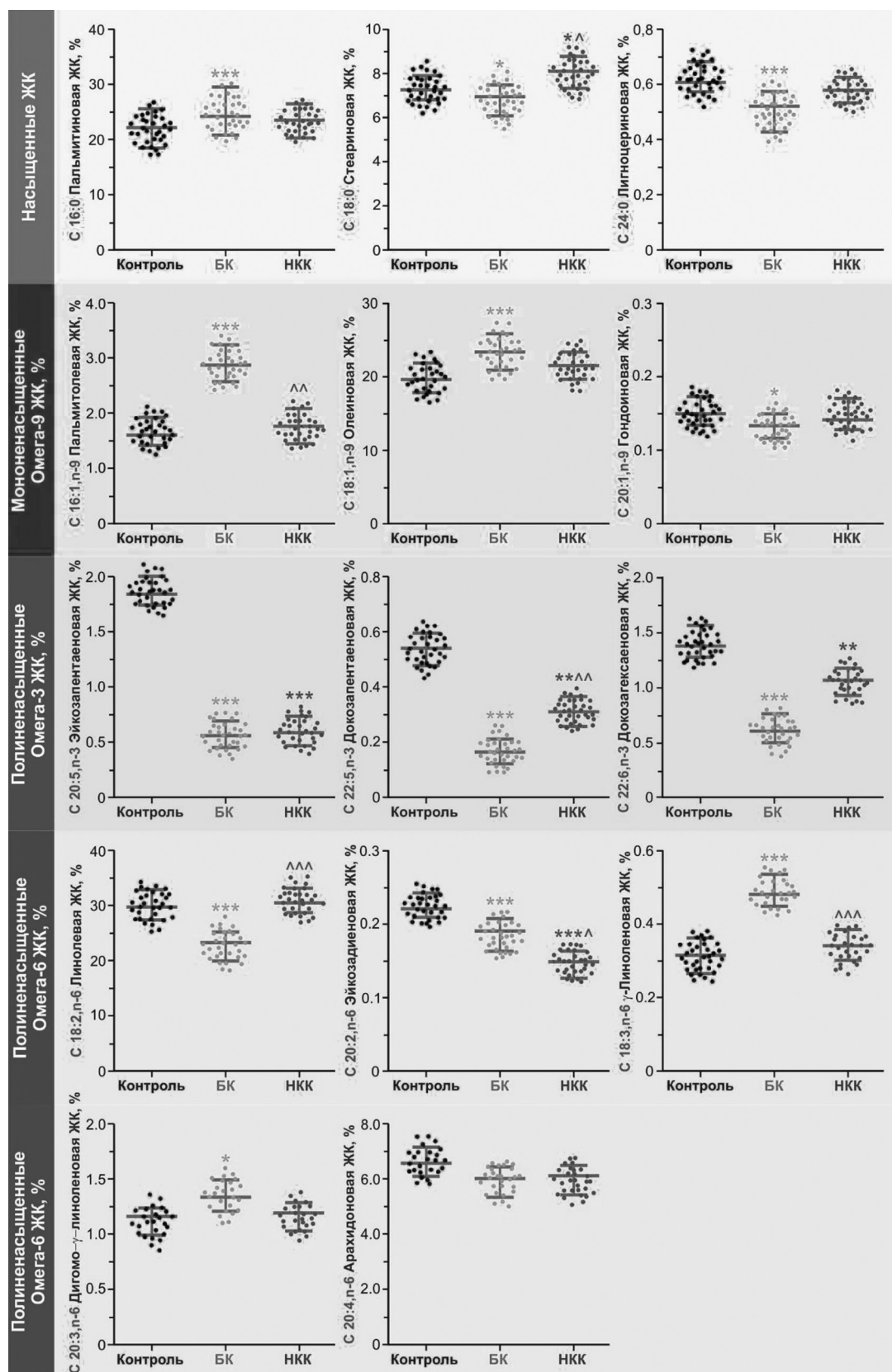
У пациентов с неклассифицируемыми колитами уровни большей части ЖК сыворотки крови занимали промежуточное положение между

величинами у здоровых и пациентов с болезнью Крона, при этом уровни стеариновой (C18:0), докозапентаеновой (C22:5 n-3), линолевой (C18:2 n-6) были достоверно выше, а пальмитолевой (C16:1n-9), эйкокадиеновой (C20:2 n-6), γ-линоленовой (C18:3 n-6) – ниже, чем при болезни Крона (p<0,05–0,01).

Общий тренд уровней жирных кислот в мембранах эритроцитов совпадал с таковым в сыворотке крови, но относительное процентное содержание было выше (рисунок 2). При болезни Крона в фосфолипидах мембран эритроцитов выявлено достоверно большее содержание ряда насыщенных ЖК (пальмитиновой C16:0, стеариновой C18:0, лигноцериновой C24:0), моновенасыщенных омега-9 ЖК (пальмитолевой C16:1n-9, олеиновой C18:1n-9) и омега-6 ПНЖК (γ-линоленовой C18:3 n-6, дигомо-γ-линоленовой C20:3 n-6) (p<0,05–0,001).

Напротив, уровни гондоиновой (20:1n-9), омега-3 ПНЖК (эйкозапентаеновой C20:5 n-3, докозапентаеновой C22:5 n-3, докозагексаеновой C22:6

Рисунок 1.
Уровни ЖК сыворотки
крови в обследованных
группах (%).



n-3) омега-6 ПНЖК (линолевой C18:2 n-6, эйкозадиеновой C20:2 n-6, арахидоновой C20:4 n-6) оказались достоверно ниже, чем у здоровых лиц ($p=0,03-0,001$).

Уровни жирных кислот пациентов с неклассифицируемыми колитами, занимая промежуточное

место между уровнями у здоровых и лиц с болезнью Крона, достоверно отличались от контроля ($p<0,05-0,01$), но не от пациентов с болезнью Крона.

Активность ферментов метаболизма ЖК – дельта-6 десатуразы и элонгазы оказалась достоверно выше у пациентов с БК, чем у здоровых и больных

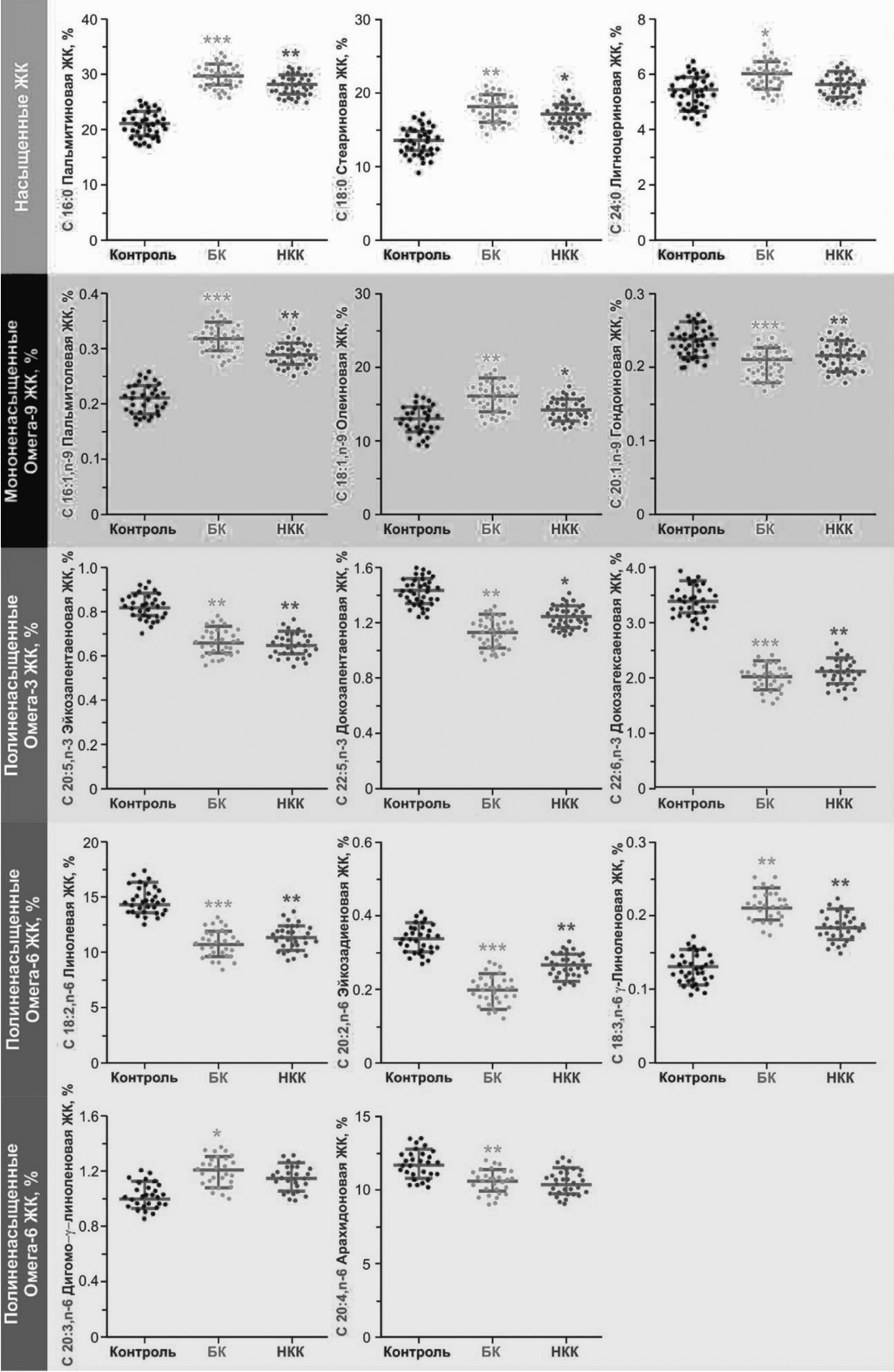


Рисунок 2.
Уровни ЖК мембран эритроцитов в обследованных группах (%).

с НKK ($p < 0,05 - 0,001$). Последние имели более высокую активность ферментов, чем в контроле для десатуразы сыворотки и элонгазы мембран эритроцитов ($p < 0,01$) (рисунок 3).

Из всей совокупности жирных кислот наиболее выраженные различия между пациентами

с БК и здоровыми выявлены по уровню пальмитиновой кислоты, который оказался максимально повышен при болезни Крона, и линолевой, уровень которой, напротив, оказался значительно сниженным. Кроме того, значимыми в различии оказались и соотношения жирных кислот,

Рисунок 3.
Активность дельта-6 десатуразы и элонгазы в сыворотке крови (левая часть рисунка) и в мембранах эритроцитов (правая часть рисунка) у пациентов с ВЗК.

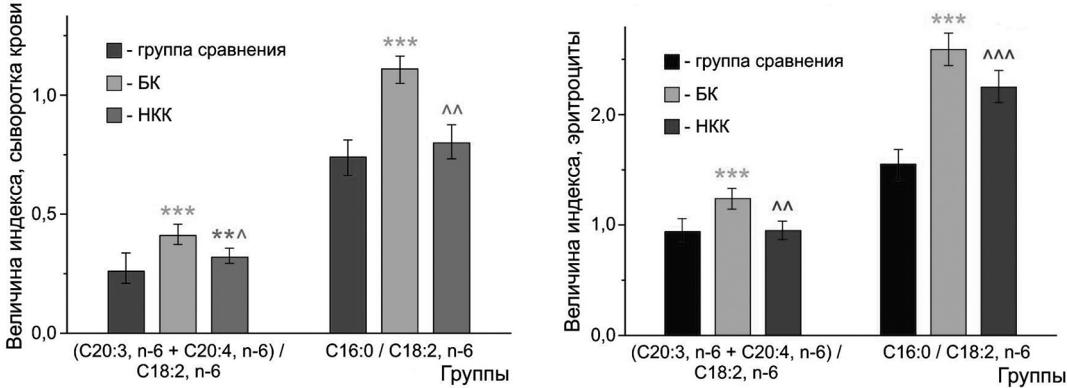


Таблица 2.
Дифференцирующие значения уровней ЖК и их индексов в мембранах эритроцитов

Жирные кислоты,%	Группы обследованных	
	Группа сравнения	Группа больных с болезнью Крона
Пальмитиновая ЖК (C16:0)	20,42–24,95	25,65–30,71
Линолевая ЖК (C18:2 n-6)	12,47–14,90	10,42–8,25
(C20:3 + C20:4) / C18:2	0,82–1,03	1,12–2,35
C16:0 / C18:2	1,10–2,18	2,45–3,70

отражающих активность ферментов метаболизма ЖК.

Определены дифференцирующие значения данных показателей для пациентов с БК (таблица 2), с которыми были сопоставлены уровни ЖК пациентов с НКК. У 8 больных с НКК уровни индексов находились в пределах таковых у пациентов с БК; у семи больных впоследствии была верифицирована болезнь Крона, что свидетельствует о высоком потенциале данного подхода для целей дифференциальной диагностики.

Уровень пальмитиновой кислоты и соотношения ЖК были использованы при проведении ROC-анализа для дифференцирования пациентов с БК от здоровых лиц (рисунок 4). Созданные диагностические панели (ЖК сыворотки крови и мембран эритроцитов) позволили дифференцировать пациентов с БК от здоровых лиц с достаточно высокими уровнями чувствительности и специфичности (для мембран эритроцитов – панель 1 (C16:0) – AUC 0,791, чувствительность 0,80, специфичность 0,74; панель 2 (C20:3+C20:4)/C18:2) – AUC 0,813, чувствительность 0,82, специфичность 0,66; панель 3 (C16:0/ C18:2) – AUC 0,813, чувствительность 0,82, специфичность 0,88). Наилучшие диагностические показатели выявлены у соотношения C16:0/C18:2 в сыворотке крови и мембранах эритроцитов, которое показало чувствительность 80%, специфичность 80%, прогностическую ценность положительного результата 78%, отрицательного результата 79%, диагностическую точность 82%, специфичность 88%, прогностическую ценность положительного результата 85%, отрицательного результата 83%, диагностическую точность 84% для мембран эритроцитов.

Обсуждение

В настоящем исследовании изучено процентное содержание каждой из жирных кислот по отношению к сумме всех ЖК, поскольку абсолютные уровни ЖК имеют значительный разброс значений.

В нашей работе преобладающая часть жирных кислот у пациентов с болезнью Крона и неклассифицируемыми колитами показали однонаправленные тренды изменений в сыворотке крови и мембранах эритроцитов. Исключение составили насыщенные ЖК – стеариновая C18:0 и лигноцериновая C24:0, уровни которых оказались ниже в сыворотке крови с накоплением в мембранах эритроцитов. Сниженные уровни арахидоновой ЖК (C20:4 n-6) были выявлены лишь в мембранах эритроцитов пациентов с болезнью Крона, что может быть связано с ее повышенным расходом в арахидоновом каскаде с образованием провоспалительных цитокинов (простагландин E₂ (PGE₂), лейкотриен B₄ (LTB₄), тромбоксан A₂ (TXA₂) [12, 13].

В исследовании Veglia F. et al. [14] показана роль арахидоновой кислоты в механизме репрограммирования нейтрофилов белком 2, транспортирующим жирные кислоты (FATP2). Появляющиеся в ходе данного процесса полиморфноядерные миелоидные супрессорные клетки (PMN-MDSC) являются патологически активированными нейтрофилами, которые имеют решающее значение для регуляции иммунных реакций, в том числе, вероятно, при болезни Крона.

На состав n-6 ПНЖК в плазме или жизненно важных клеточных мембранах может влиять потребление пищи, образ жизни и демографические характеристики [15, 16]. Предполагалось также, что гендерные и присущие поколению различия

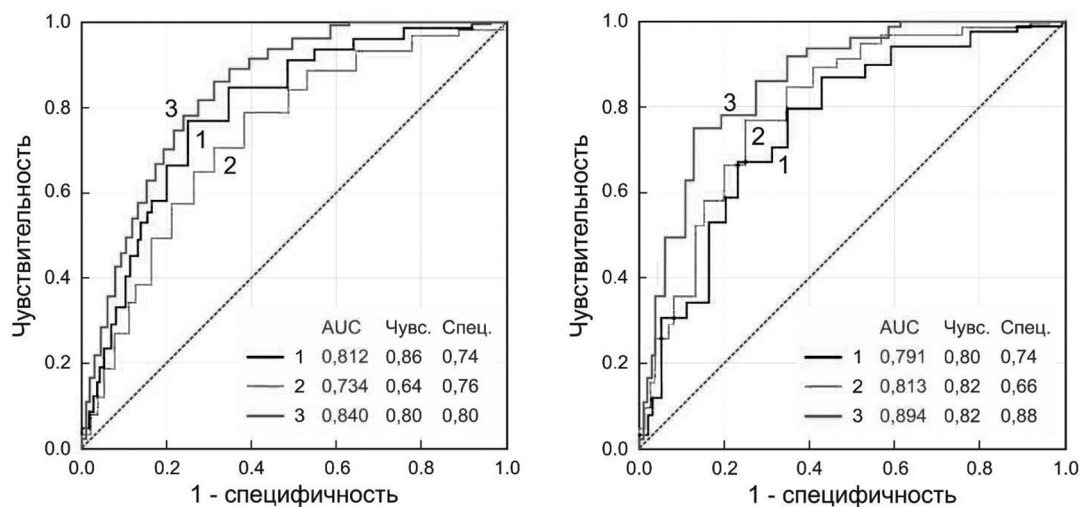


Рисунок 4. ROC-анализ для потенциальных биомаркеров: а) сыворотка крови, б) мембраны эритроцитов. Панель 1 – пальмитиновая ЖК (C16:0); панель 2 – (C20:3+C20:4)/C18:2; панель 3 – C16:0/ C18:2.

влиять на предпочтения и привычки в еде [7], поэтому в нашей работе группа здоровых обследованных была сопоставима по возрасту и полу с пациентами с ВЗК.

Сниженные уровни линолевой кислоты в сыворотке крови и мембранах эритроцитов, по данным настоящего исследования, косвенно свидетельствуют о ее повышенном метаболизме у пациентов с БК, что подтверждается повышенной активностью фермента дельта-6 десатуразы. Следует отметить, что у пациентов с НКК уровень линолевой кислоты оказался также достоверно ниже, чем в контроле ($p < 0,001$). В работе Uchiyama K. et al. также показана активация дельта-6 десатуразы при болезни Крона по сравнению со здоровыми [7]. Таким образом, n-6 ПНЖК, то есть линолевая ЖК, может быть эффективно метаболизирована в арахидоновую ЖК у пациентов с БК. В свою очередь, арахидоновая кислота может метаболизироваться до биоактивных эйкозаноидов, таких как простагландины, лейкотриены, тромбоксаны и липоксины, которые участвуют в воспалении и агрегации тромбоцитов. Исследования Sharon P. et al., Hommes D. W. et al. показали, что производство лейкотриенов и простагландинов увеличивается в слизистой оболочке кишечника у пациентов с болезнью Крона [17, 18], а потребление большого количества n-6 ПНЖК связано с повышенным риском развития ВЗК [19].

Seimon et al. [20] сообщили, что насыщенные жирные кислоты могут способствовать макрофагальному воспалению и липотоксичности. Повышенная токсичность насыщенных ЖК может быть в определенной степени обусловлена тем фактом, что они менее эффективно этерифицируются в триглицериды. Хотя механизмы, лежащие в основе липотоксичности, в настоящее время неизвестны, накопление пальмитиновой кислоты в макрофагах может быть связано с воспалением [21]. В настоящем исследовании процентное содержание пальмитиновой C16:0 и пальмитолеиновой C16:1 в сыворотке крови и мембранах эритроцитов были выше у пациентов с БК по сравнению со здоровыми, в то время как уровень стеариновой ЖК C18:0 в сыворотке крови был ниже, что указывает на сниженную активность элонгазы-6 у пациентов с БК. Косвенно это отражает замедление превращения пальмитиновой ЖК C16:0 в сте-

ариновую ЖК C18:0 при болезни Крона. Высокое процентное содержание пальмитиновой ЖК может индуцировать макрофаги, которые продолжают выделять воспалительные цитокины в слизистой оболочке кишечника [21]. Действительно, дельта-6 десатураза также участвует в метаболизме пальмитиновой ЖК у людей. Хотя дельта-6-десатурация пальмитиновой ЖК приводит к биосинтезу сапиеновой кислоты, эта метаболическая реакция ограничивается очень специфическими жировыми тканями, такими как сальные. Поэтому, вероятно, что этот метаболический путь не повлиял на результаты настоящего исследования.

Повышенные уровни мононенасыщенных ЖК C16:1n-9 и олеиновой C18:1n-9 в сыворотке крови и мембранах эритроцитов могут оказывать эпигенетические воздействия. Так, показано, МНЖК (в том числе, наиболее распространенная олеиновая ЖК – C18:1 n-9), подавляют передачу сигналов PTEN / Akt и регулируют эпителиально-мезенхимальный переход [22].

По данным настоящей работы у пациентов с БК оказались сниженными уровни омега-3 ПНЖК – C20:5n-3, C22:5n-3, C22:6n-3 как в сыворотке крови, так и в мембранах эритроцитов у пациентов с БК по сравнению с контрольной группой. Омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты, такие как α -линоленовая кислота, метаболизируются в эйкозапентаеновую кислоту (C20:5n-3) и докозагексаеновую кислоту (C22:6n-3) теми же десатуразами, которые участвуют в метаболизме омега-6 ПНЖК. Следовательно, n-3 ПНЖК могут ингибировать арахидоновый каскад конкурентно антагонизирующими ферментами (дельта 6- и дельта-5-десатуразы, циклооксигеназы и липоксигеназы), тем самым обеспечивая противовоспалительные эффекты, ингибируя синтез воспалительных медиаторов АА и TXA2 [23–25]. Снижение процентного содержания омега-3 ПНЖК, в том числе, эйкозапентаеновой ЖК, которая оказывает противовоспалительное действие через TLR4 в макрофагах, может способствовать активации воспаления у пациентов с БК.

Li Q. et al. (2007) обнаружили, что докозагексаеновая и эйкозапентаеновая кислота изменяли липидную среду в мембранных микродоменах плотного соединения клеток кишечника in vitro. Экспозиция

с омега-3 ПНЖК эффективно предотвращала перераспределение окклюдина, ZO-1 и искажение морфологии плотных контактов клеток, уменьшало трансэпителиальное электрическое сопротивление, индуцированное цитокинами IFN- γ и TNF- α . Таким образом, было показано, что омега-3 ПНЖК играют важную роль в индуцированных провоспалительными цитокинами дефектах проницаемости и дисфункции эпителиального барьера путем модификации липидной среды в мембранных микродоменах плотного соединения [26].

В то же время, процентное содержание омега-6 ПНЖК – γ -линоленовой C18:3 n-6 и дигомо- γ -линоленовой C20:3 n-6 – оказалось достоверно выше у пациентов с болезнью Крона по сравнению со здоровыми обследованными. С одной стороны, это свидетельствует об ускоренном метаболизме линолевой кислоты, что объясняет существенное снижение ее содержания в мембранах эритроцитов и сыворотке крови. С другой стороны, дигомо- γ -линоленовая C20:3 n-6 кислота является субстратом для синтеза простагландинов и тромбоксанов (1 серия) и лейкотриенов (3 серия), которые поддерживают воспаление в кишке.

Изменения в соотношении арахидоновой, дигомо- γ -линоленовой и линолевой жирных кислот сказались на уровне индекса дельта-6-десатурации, который отражает активность дельта-6-десатуразы. По данным нашей работы, она оказалась повышенной у пациентов с БК, что свидетельствует о том, линолевая ЖК быстрее метаболизируется в арахидоновую у пациентов с болезнью Крона. Известно, что доля жирных кислот в жизненно важных клеточных мембранах поддерживается гомеостазом посредством активности десатураз, которые обычно контролируются посредством обратной связи [27]. Вероятно, у пациентов с БК нарушена регуляция обратной связи десатурации ПНЖК.

Наиболее выраженные различия в уровнях ЖК коснулись пальмитиновой, содержание которой оказалось повышенным в максимальной степени у пациентов с БК по сравнению со здоровыми лицами, а также линолевой, уровень которой был, напротив, значительно сниженным у пациентов с ВЗК. Подобные полярные различия в содержании данных ЖК, как и их соотношение C16:0/ C18:2 оказались значимыми для различения пациентов с болезнью Крона. Соотношение (C20:3+C20:4)/C18:2, отражающее активность дельта-6-десатуразы, подтверждало измененный метаболизм ЖК; оно также позволило с достаточной точностью дифференцировать пациентов с БК от здоровых. Именно вышеописанные параметры вошли в состав «пилотных» диагностических панелей для различения пациентов с БК от здоровых. Следует заметить, что C16:0/ C18:2 показало наилучшие результаты по сравнению с другими панелями (AUC для сыворотки крови 0,84, для мембран эритроцитов – 0,894). Данные результаты сопоставимы по специфичности (80–88% против 82–89%) и превосходят по чувствительности (80–82% против 32–72%) возможности диагностических панелей, состоящих из антител против *Saccharomyces cerevisiae* и антинейтрофильных цитоплазматических антител (Zholudev et al. [27]), предложенных

как специфические серологические маркеры для пациентов с БК.

Следует заметить, что уровни большей части ЖК у пациентов с неклассифицируемыми колитами занимали промежуточное положение между таковыми при болезни Крона и у здоровых лиц. Можно предположить, что часть пациентов с НКК имели не верифицированную болезнь Крона. В клинической практике установление диагноза у пациентов с ВЗК – это сложный, порой многолетний процесс. Вероятно, существует потенциал использования уровней вышеописанных жирных кислот и их отношений для диагностических целей. Это продемонстрировало сопоставление уровней ЖК у больных с НКК с дифференцирующими значениями ЖК для пациентов с болезнью Крона. Подтверждение диагноза «болезнь Крона» у пациентов с НКК, уровни жирных кислот которых оказались в пределах значений для группы БК, показывает перспективность данного подхода и необходимость дальнейших исследований в данном направлении.

Таким образом, на основании проведенного исследования можно сделать следующие выводы:

- Уровни большей части насыщенных, мононенасыщенных омега-9, омега-6 ПНЖК оказались достоверно выше, а содержание преобладающей части омега-3, ряда омега-6 (линолевой, эйкозодиеновой, арахидоновой) – ниже, чем у здоровых лиц. Относительное содержание ЖК у больных с неклассифицируемыми колитами оказалось промежуточным между таковыми у больных с БК и здоровыми.
- Активности дельта-6-десатуразы, элонгазы в сыворотке крови и мембранах эритроцитах у пациентов с болезнью Крона выше, чем у здоровых лиц и больных с НКК ($p < 0,05$ – $0,001$).
- Созданные диагностические панели (ЖК сыворотки крови и мембран эритроцитов) позволили дифференцировать пациентов с БК от здоровых лиц с достаточно высокими уровнями чувствительности и специфичности (для Эр – панель 1 – AUC 0,791, чувс. 0,80, спец. 0,74; панель 2 – AUC 0,813, чувс. 0,82, спец. 0,66; панель 3 – AUC 0,894, чувс. 0,82, спец. 0,88). Наилучшие диагностические показатели выявлены у соотношения C16:0/C18:2 в сыворотке крови и мембранах эритроцитов (для мембран эритроцитов – чувствительность 82%, специфичность 88%, прогностическая ценность положительного результата 85%, отрицательного результата 83%, диагностическая точность 84%).
- Полученные дифференцирующие значения уровней ЖК и их индексов в мембранах эритроцитов позволили выявить пациентов с предполагаемой болезнью Крона из тех, у кого диагностирован неклассифицируемый колит, что свидетельствует о высоком потенциале данного подхода для целей дифференциальной диагностики.
- Выявленные особенности уровней ЖК мембран Эр и СК, а также их соотношения у пациентов с БК перспективны для целей дифференциальной диагностики, в том числе, в случаях неклассифицируемых колитов.

Литература | References

1. Sands B. E., Siegel C. A. Crohn's disease. In: Feldman M., Friedman L. S., Brandt L. J., eds. *Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease*. 9th ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier. 2010. chap 111.
2. Burisch J., Munkholm P. Inflammatory bowel disease epidemiology. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 2013, Vol. 29, No. 4, pp. 357–362.
3. Abraham C., Cho J. H. Inflammatory bowel disease. *N. Engl. J. Med.* 2009, Vol. 361, pp. 2066–2078.
4. Harris M. L., Bayless T. M. Dietary antigens as aggravating factors in Crohn's disease. *Dig. Dis. Sci.* 1989, Vol. 34, pp. 1613–1614.
5. Sartor R. B. Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel diseases. *Am. J. Gastroenterol.* 1997, Vol. 92, pp. 5S–11S.
6. Powell J. J., Harvey R. S., Ashwood P., Wolsten-croft R., Gershwin M. E., Thompson R. P. Immune potentiation of ultrafine dietary particles in normal subjects and patients with inflammatory bowel disease. *J. Autoimmun.* 2000, Vol. 14, pp. 99–105.
7. Uchiyama K., Odahara S., Nakamura M., et al. The fatty acid profile of the erythrocyte membrane in initial-onset inflammatory bowel disease patients. *Dig. Dis. Sci.* 2013, Vol. 58, pp. 1235–1243.
8. Кручинина М. В., Азгалдян А. В., Светлова И. О., Шашков М. В., Соколова А. С., Кручинин В. Н. Особенности состава жирных кислот сыворотки крови и мембран эритроцитов у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника (пилотное исследование). *Современные проблемы науки и образования*, 2019, № 3. <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=28868> (дата обращения: 10.06.2019). DOI: 10.17513/spno.28868.
9. Friedman A. N., Yu Z., Tabbey R., Denski C., et al. Low blood levels of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids in US hemodialysis patients: clinical implications. *Am. J. Nephrol.* 2012, Vol. 36, pp. 451–458.
10. Arab L., Akbar J. Biomarkers and the measurement of fatty acids. *Public Health Nutr.* 2002, Vol. 5, pp. 865–871.
11. Кручинина М. В., Кручинин В. Н., Прудникова Я. И., Громов А. А., Шашков М. В., Соколова А. С. Исследование уровня жирных кислот мембран эритроцитов и сыворотки крови у пациентов с колоректальным раком г. Новосибирска. *Успехи молекулярной онкологии*. – 2018. – Т. 5. – № 2. – С. 50–61.
12. Stillwell W. An introduction to biological membranes. Composition, structure and function. Second edition – UK London: Elsevier. 2016. 432 p.
13. Veglia F., Tyurin V. A., Blasi M., De Leo A., et al. Fatty acid transport protein 2 reprograms neutrophils in cancer. *Nature*. 2019. Vol. 569, No. 7754, pp. 73–78.
14. Hodson L., Skeaff C. M., Fielding B. A. Fatty acid composition of adipose tissue and blood in humans and its use as a biomarker of dietary intake. *Prog. Lipid. Res.* 2008, Vol. 47, pp. 348–380.
15. Asciutti-Moura L. S., Guillard J. C., Fuchs F., Richard D., Klepping J. Fatty acid composition of serum lipids and its relation to diet in an elderly institutionalized population. *Am. J. Clin. Nutr.* 1988. Vol. 48, pp. 980–987.
16. Sharon P., Stenson W. F. Enhanced synthesis of leukotriene B₄ by colonic mucosa in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1984, Vol. 86, pp. 453–460.
17. Hommes D. W., Meenan J., de Haas M., et al. Soluble Fc gamma receptor III (CD16) and eicosanoid concentrations in gut lavage fluid from patients with inflammatory bowel disease: reflection of mucosal inflammation. *Gut*. 1996, Vol. 38, pp. 564–567.
18. Tjonneland A., Overvad K., Bergmann M. M., Nagel G., et al. Linoleic acid, a dietary n-6 polyunsaturated fatty acid, and the aetiology of ulcerative colitis: a nested case-control study within a European prospective cohort study. *Gut*. 2009, Vol. 58, pp. 1606–1611.
19. Seimon T. A., Nadolski M. J., Liao X., Magallon J., et al. Atherogenic lipids and lipoproteins trigger CD36-TLR2-dependent apoptosis in macrophages undergoing endoplasmic reticulum stress. *Cell Metab.* 2010, Vol. 12, pp. 467–482.
20. Saraswathi V., Hasty A. H. Inhibition of long-chain acyl coenzyme A synthetases during fatty acid loading induces lipotoxicity in macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2009, Vol. 29, pp. 1937–1943.
21. Fritz V., Benfodda Z., Rodier G., Henriquet C., et al. Abrogation of de novo lipogenesis by stearyl-CoA desaturase 1 inhibition interferes with oncogenic signaling and blocks prostate cancer progression in mice. *Mol. Cancer Ther.* 2010, Vol. 9, pp. 1740–54.
22. Igarashi O., Sugano M., Ikeda I. *A Modern Viewpoint of the Fatty Acid Nutrition* Tokyo: Koseikan. 1998. 563 p.
23. Okuyama H., Kobayashi T., Watanabe S. Dietary fatty acids – The n-6/n-3 balance and chronic elderly disease. *Prog. Lipid Res.* 1997. Vol. 35, pp. 409–457.
24. Saku N., Kobayashi J., Kitamura S. Eicosapentaenoic acid modulates arachidonic acid metabolism in rat alveolar macrophages activated by silica. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*. 1999. Vol. 61, pp. 51–54.
25. Li Q., Zhang Q., Wang M., Zhao S., Xu G., Li J. n-3 polyunsaturated fatty acids prevent disruption of epithelial barrier function induced by proinflammatory cytokines. *Molecular Immunology*, 2008, Vol. 45, pp. 1356–1365.
26. Lans W. E. M. *Fish and Human Health* – New York: NY Academic Press, 1986. 458 p.
27. Zholudev A., Zurakowski D., Young W., Leichtner A., Bousvaros A. Serologic testing with ANCA, ASCA, and anti-OmpC in children and young adults with Crohn's disease and ulcerative colitis: diagnostic value and correlation with disease phenotype. *Am. J. Gastroenterol.* 2004, Vol. 99, pp. 2235–2241.

Работа выполнена в рамках темы «Эпидемиологический мониторинг состояния здоровья населения и изучение молекулярно-генетических и молекулярно-биологических механизмов развития распространенных терапевтических заболеваний в Сибири для совершенствования подходов к их диагностике, профилактике и лечению» ГЗ № 0324–2018–0001, Пер. № AAAA-A17–117112850280–2.