

ВЛИЯНИЕ ОМЕГА-3 ПОЛИНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ НА ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ И ВЯЗКОУПРУГИЕ ПАРАМЕТРЫ ЭРИТРОЦИТОВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ IN VITRO У ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ КРОНА В СТАДИИ ОБОСТРЕНИЯ

**EFFECT OF OMEGA-3
POLYUNSATURATED FATTY ACIDS
ON ELECTRIC AND VISCOELASTIC
PARAMETERS OF ERYTHROCYTES
IN THE IN VITRO EXPERIMENT
IN PATIENTS WITH CROHN DISEASE
IN THE ACUTE STAGE**

**M. Kruchinina
A. Gromov
V. Generalov
N. Abaltusova
E. Kruchinina**

Summary. The aim of the study was to study changes in the electrical and viscoelastic parameters of erythrocytes in patients with Crohn's disease in the acute stage after exposure to solutions of omega-3 PUFAs (eicosapentaenoic, docosahexaenoic) in vitro experiment.

Materials and methods. We examined 41 patients with Crohn's disease (mean age 38 ± 13.05 years) in the acute stage and 53 people in the comparison group, comparable to the main group in terms of gender and age. The electrical and viscoelastic parameters of erythrocytes were studied in an inhomogeneous alternating electric field at four frequencies of 5×10^4 Hz, 105 Hz, 5×10^5 Hz and 106 Hz by dielectrophoresis method twice: before and after exposure for 2 hours with 10 μ l of eicosapentaenoic (EPA, 20: 5 n-3) and 10 μ l of docosahexaenoic (DHA, 22: 6 n-3) omega 3 PUFA (Sigma-Aldrich, USA).

Results. The erythrocytes of patients with Crohn's disease in the acute stage differed from the erythrocytes of the control group by an increase in the number of spherocytic, deformed forms of cells with a changed surface with a decrease in the proportion of discocytes ($p < 0.00001$). The amplitude of cell deformation at high frequencies in patients with CD was found to be lower than those for controls at the background of increased summarized indicators of viscosity and rigidity ($p < 0.00001$). In patients with CD, erythrocytes tended to form aggregates and destruction at different frequencies of the electric field ($p = 0.014-0.05$). The polarizability at frequencies of 106, 0.5×10^6 , 105 Hz turned out to be lower, and at a frequency of (0.5×10^4) Hz it was higher in the presence of inflammatory bowel disease compared to the control group ($p = 0.0001-0.03$). The erythrocytes of patients with Crohn's

Кручинина Маргарита Витальевна

Д.м.н., доцент, в.н.с., НИИ терапии
и профилактической медицины — филиал ФГБНУ
«Федеральный исследовательский центр Институт
цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук»; Новосибирский
государственный медицинский университет
Минздрава России
kruchmargo@yandex.ru

Громов Андрей Александрович

К.м.н., с.н.с., НИИ терапии и профилактической
медицины — филиал ФГБНУ «Федеральный
исследовательский центр Институт цитологии
и генетики Сибирского отделения Российской
академии наук»
gromov.center@rambler.ru

Генералов Владимир Михайлович

Д.т.н., в.н.с., ФБУН «Государственный научный
центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека
vmgeneral@mail.ru

Абалтусова Наталья Владиславовна

М.н.с., НИИ терапии и профилактической
медицины — филиал ФГБНУ «Федеральный
исследовательский центр Институт цитологии
и генетики Сибирского отделения Российской
академии наук»
abaltusova79@mail.ru

Кручинина Элина Владимировна

Новосибирский государственный медицинский
университет Минздрава России
linkruchinina@yandex.ru

Аннотация. Цель исследования — изучить изменения электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов у пациентов с болезнью Крона в стадии обострения после экспозиции с растворами омега-3 ПНЖК (эйкозапентаеновой, докозагексаеновой) в эксперименте in vitro.

Материалы и методы. Обследован 41 пациент с болезнью Крона (средний возраст $38 \pm 13,05$ лет) в стадии обострения и 53 человека группы сравнения, сопоставимые с основной группой по полу и возрасту. Электрические и вязкоупругие параметры эритроцитов исследованы в неоднородном переменном электрическом поле на четырех частотах 5×10^4 Гц, 105 Гц, 5×10^5 Гц и 106 Гц методом диэлектрофореза дважды: до и после экспозиции.

disease had higher levels of electrical conductivity and lower levels of membrane capacity, speed of cell movement to the electrodes, dipole moment than those in the controls ($p = 0.0001-0.0008$). The crossover frequency in patients with IBD turned out to be shifted to the high-frequency range.

Exposure of erythrocytes of patients with Crohn's disease *in vitro* for 2 hours with 10 μL solutions of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids led to a significant change in the electrical and viscoelastic parameters of erythrocytes: a decrease in the summarized indicators of rigidity, cell viscosity, electrical conductivity, aggregation and destruction indices at all frequencies of the electric field; an increase in the levels of capacity, dipole moment, the speed of cell movement to the electrodes, polarizability ($p = 0.001-0.05$). There were revealed tendencies to an increase in the diameter of erythrocytes, the amplitude of cell deformation at high frequencies of the electric field, the proportion of discocytic forms with a decrease in spherocytic, deformed ones. There is a trend towards a shift of the crossover frequency to the low-frequency range. The observed changes in the electrical and viscoelastic parameters of erythrocytes are probably due to the modification of the structure of membranes (membrane signaling platforms) under the influence of omega-3 polyunsaturated fatty acids, changes in the activity of membrane proteins — receptors and enzymes that perform transport functions, and an indirect effect on the cell cytosol.

Conclusion. The revealed effects of omega-3 PUFAs on the electrical and viscoelastic parameters of erythrocytes in patients with Crohn's disease in the acute stage may be promising as additional influence on the induction and maintenance of remission of this disease.

Keywords: omega-3 polyunsaturated fatty acids, electrical, viscoelastic parameters of erythrocytes, dielectrophoresis, Crohn's disease, *in vitro* experiment.

зиции в течение 2 часов с 10 мкл эйкозапентаеновой (ЭПК, 20:5 n-3) и 10 мкл докозагексаеновой (ДГК, 22:6 n-3) омега 3 ПНЖК (Sigma-Aldrich, США).

Результаты. Эритроциты пациентов с болезнью Крона в стадии обострения отличались от эритроцитов лиц контрольной группы увеличением количества сфероцитарных, деформированных форм клеток с измененной поверхностью при снижении доли дискоцитов ($p < 0,00001$). Амплитуда деформации клеток на высоких частотах у больных с БК оказалась ниже на фоне повышенных обобщенных показателей вязкости и жесткости ($p < 0,00001$). У пациентов с БК эритроциты имели склонность к образованию агрегатов и деструкции на разных частотах электрического поля ($p = 0,014-0,05$). Поляризуемость на частотах 106, $0,5 \times 106$, 105 Гц оказалась ниже, а на частоте ($0,5 \times 104$) Гц выше ($p = 0,0001-0,03$). при наличии воспалительного заболевания кишечника по сравнению с группой контроля. Эритроциты пациентов с болезнью Крона имели более высокие уровни электропроводности и более низкие — емкости мембран, скорости движения к электродам, дипольного момента, чем в контроле ($p = 0,0001-0,0008$). Равновесная частота у пациентов с ВЗК оказалась смещенной в высокочастотный диапазон.

Экспозиция эритроцитов пациентов с болезнью Крона *in vitro* в течение 2 часов с 10 мкл растворов эйкозапентаеновой и докозагексаеновой кислот привела к достоверному изменению электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов: снижению обобщенных показателей жесткости, вязкости клеток, электропроводности, индексов агрегации и деструкции на всех частотах электрического поля, повышению уровней емкости, дипольного момента, скорости движения клеток к электродам, поляризуемости ($p=0,001-0,05$). Выявлены тенденции к увеличению диаметра эритроцитов, амплитуды деформации клеток на высоких частотах электрического поля, доли дискоцитарных форм при снижении сфероцитарных, деформированных. Отмечен тренд к смещению равновесной частоты в низкочастотный диапазон. Наблюдаемые изменения электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов, вероятно, обусловлены модификацией структуры мембран (мембранных сигнальных платформ) под воздействием омега-3 полиненасыщенных жирных кислот, изменением активности мембранных белков — рецепторов и ферментов, выполняющих транспортные функции, и косвенным влиянием на цитозоль клетки.

Заключение. Выявленные эффекты омега-3 ПНЖК на электрические и вязкоупругие параметры эритроцитов у пациентов с болезнью Крона в стадии обострения могут быть перспективны как дополнительные воздействия для индукции и поддержания ремиссии при данном заболевании.

Ключевые слова: омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты, электрические, вязкоупругие параметры эритроцитов, диэлектрофорез, болезнь Крона, эксперимент *in vitro*.

Блезнь Крона (БК) — это хроническое воспалительное заболевание желудочно-кишечного тракта, симптомы которого развиваются по рецидивирующей и ремиттирующей моделям. Это прогрессирующая патология может затрагивать все сегменты желудочно-кишечного тракта, наиболее частыми из которых являются терминальный отдел подвздошной кишки и толстая кишка. Воспаление обычно бывает сегментарным, асимметричным и трансмуральным. У большинства пациентов при диагностике обнаруживается воспалительный фенотип, со временем у половины пациентов развиваются осложнения (стриктуры, свищи или абсцессы), часто приводящие к хирургическому вмешательству [1, 2]. Современные терапевтические стратегии направлены на достижение полной и продолжительной ремиссии с целью предотвращения осложнений и остановки прогрессирующего течения заболевания.

В качестве одной из дополнительных стратегий для индукции и поддержания ремиссии у пациентов с болезнью Крона Uchiyama K. et al. предложили введение пищевых омега-3 полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), поскольку обнаружено значительное снижение их уровня в период обострения заболевания [3]. Действительно, 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 [4]. Следовательно, ферменты, участвующие в метаболизме линолевой кислоты, например, дельта-6-десатуразы, считаются гиперактивированными у пациентов с БК. Выявлены более низкие уровни дигомо-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 язвенным колитом [5]. Изменения в уровнях полиненасыщенных жирных кислот, в том числе, омега-3 и омега-6, связаны с их участием в ключевых биологических процессах, включая физиологические процессы в клеточной мембране, эйкозаноидное продуцирование, воспаление, регуляцию и экспрессию генов [6]. В наших работах показано достоверное снижение уровней омега-3 ПНЖК — (эйкозапентаеновой C20:5 n-3, докозапентаеновой C22:5 n-3, докозагексаеновой C22:6 n-3) мембран эритроцитов и сыворотки крови у пациентов с болезнью Крона [7, 8].

Структура и функция клеток красной крови тесно взаимосвязаны [9], способность эритроцитов к деформации определяется целым рядом факторов [10],

включая структуру их мембран. В исследованиях [11] показаны тесные корреляции между уровнями фосфолипидов, жирных кислот у пациентов с диффузной патологией печени и электрическими, вязкоупругими параметрами эритроцитов. В то же время, имеются данные о выраженных изменениях функциональных показателей клеток красной крови у пациентов с болезнью Крона по сравнению со здоровыми лицами, а также больными с язвенным колитом, неклассифицируемым колитом [12, 13, 14].

Гипотеза настоящего исследования состояла в том, что имеющийся дефицит омега-3 ПНЖК в мембранах эритроцитов пациентов с болезнью Крона в стадии обострения можно восполнить в эксперименте *in vitro*, что скажется на изменении электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов.

Цель исследования — изучить изменения электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов у пациентов с болезнью Крона в стадии обострения после экспозиции с растворами омега-3 ПНЖК (эйкозапентаеновой, докозагексаеновой) в эксперименте *in vitro*.

Материалы и методы

Группа пациентов с болезнью Крона в стадии обострения (индекс Беста $181,1 \pm 37,4$ балла) — состояла из 41 человека, средний возраст $38 \pm 13,05$ лет, из них 21 мужчина (51,2%) и 20 женщин (49,8%). Диагноз верифицирован на основании сочетания данных анамнеза, клинической картины и типичных эндоскопических и гистологических изменений [15].

Средняя длительность анамнеза заболевания составила ($7,96 \pm 6,81$) года. Большая часть пациентов — 38 человек (92,68%) — имели хроническое течение заболевания (из них 34 (82,93%) — рецидивирующее; 4 пациента (9,76%) — непрерывное течение). У троих больных (7,32%) отмечено острое течение БК. У преобладающего числа пациентов — 30 (73,17%) выявлена инфильтративно-воспалительная форма БК, у 6 (14,63%) — пенетрирующий, у 5 (12,2%) — стенозирующий фенотипический вариант БК.

По клинической активности большая часть больных с БК имели умеренную 26 (63,4%) или минимальную — 10 (24,4%) степень, лишь в 4 случаях (9,76%) она оказалась высокой. Эндоскопическая и гистологическая активность в преобладающем числе случаев соответствовала умеренной степени (у 58,54% и 68,3% пациентов, соответственно).

В процессе лечения у 10 пациентов (24,4%) развилась стероидозависимость; у троих (7,3%) — резистент-

ность к кортикостероидам; 9 пациентов (21,9%) имели в анамнезе операции, связанные с развитием стриктур, свищей, абсцессов.

Из внекишечных проявлений у большей части больных с БК — 31 человек (75,61%) выявлена анемия, при этом в большей части случаев — анемия хронических заболеваний — 27 пациентов (65,85%), у 4 больных (9,76%) выявлена анемия смешанного генеза.

При оценке тяжести течения болезни Крона в целом в обследованной группе легкая тяжесть установлена в 7 случаях (17,1%), средняя степень тяжести — у 26 пациентов (63,4%) и тяжелое течение — у 8 больных (19,5%).

Группу сравнения составили практически здоровые обследуемые — 53 человека (средний возраст $43,3 \pm 11,7$ лет, из них 25 мужчины (47,2%) и 28 женщин (52,8%), ведущие здоровый образ жизни и употребляющие алкоголь не чаще 1–2-х раз в месяц в малых дозах, у которых при клиническом, лабораторном и инструментальном обследовании не выявлено признаков манифестирующих заболеваний внутренних органов.

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.

Для проведения исследования эритроцитов методом диэлектрофореза в неоднородном переменном электрическом поле (НПЭП) клетки красной крови получали из цельной венозной крови пациентов: кровь объемом 2 мл забирали вакутейнерами в 3,7% цитратный буфер в соотношении 9:1, через 1 час 9,7–12 мкл крови вносили в 0,3 М раствор сахарозы ($pH = 7,36$) с коэффициентом $k_{0,9-1,1}$: 29–31 и переносили суспензию исследуемых эритроцитов с концентрацией клеток $1,6-1,8 \cdot 10^5$ /мкл в измерительную кювету. Сразу после разведения эритроцитов производились измерения.

В измерительной ячейке на клетки воздействовали неоднородным переменным электрическим полем со следующими параметрами: напряженность электрического поля 10^5 В/м, градиент напряженности электрического поля 10^{11} В/м², частотный диапазон $5 \cdot 10^4-10^6$ Гц, исследование проводили на четырех фиксированных частотах: $5 \cdot 10^4$ Гц, 10^5 Гц, $5 \cdot 10^5$ Гц и 10^6 Гц. [16]. Оценивали средний диаметр эритроцита [м], доли дискоцитов,

сфероцитов, деформированных клеток [%], характер поверхности [усл. ед.], поляризуемость клеток на разных частотах диапазона [м³], относительную поляризуемость (соотношение величины показателя на 10^6 Гц к 10^5 Гц), обобщенные показатели жесткости [Н/м], вязкости [Пас], электропроводность мембран [См/м], индексы деструкции (на разных частотах диапазона) [%] и агрегации [усл. ед.], амплитуду деформации эритроцитов на частоте 10^6 Гц [м], степень деформации клеток на частоте $5 \cdot 10^5$ Гц [%], емкость мембран эритроцитов [Ф], скорость движения клеток к электродам [мкм/с], положение равновесной частоты [Гц], величину дипольного момента [Клм]. Для компьютерной обработки данных использовался пакет оригинальных программ CELLFIND. Ошибка воспроизводимости метода — 7–12%.

Исследование параметров эритроцитов проведено дважды: с нативной кровью пациентов и через 2 часа экспозиции при комнатной температуре после добавления к взвеси эритроцитов в растворе сахарозы 10 мкл эйкозапентаеновой (ЭПК, 20:5 n-3) и 10 мкл докозагексаеновой (ДГК, 22:6 n-3) омега 3 ПНЖК (Sigma-Aldrich, США) (кислоты растворяли в безводном этаноле и хранили в виде исходных растворов (20 мМ) при -20 °С.). Длительность экспозиции и дозы ПНЖК, условия эксперимента были подобраны на основании исследований, проводимых на культурах тканей [17, 18].

Статистическая обработка данных выполнена с использованием программы IBM SPSS Statistics (версия 26.0). Определялся характер распределения количественных признаков методом Колмогорова–Смирнова. В случае нормального распределения вычислялось среднее значение (M) и стандартное отклонение (SD) ($M \pm SD$). При сравнении двух нормально распределенных выборок использовался t-тест Стьюдента. При отсутствии нормального распределения вычислялись медиана (Me), 25 и 75% процентиля (25%; 75%) (Me (25%; 75%)) достоверность различия показателей оценивали с помощью непараметрических критериев (U-критерий Манна-Уитни, Краскела-Уоллиса). Во всех процедурах статистического анализа критический уровень значимости нулевой гипотезы (p) принимался равным 0,05. Параметры эритроцитов отличались по характеру распределения, поэтому в таблице для единообразия представления материала показаны и средние величины со стандартным отклонением ($M \pm SD$), и медиана с процентильным распределением Me (25%; 75%).

Результаты

В таблице 1 представлены данные исследования параметров эритроцитов у пациентов с болезнью Крона

Таблица 1. Электрические и вязкоупругие параметры эритроцитов пациентов с болезнью Крона в динамике эксперимента и обследуемых группы контроля (M ± SD), (Me [25%; 75%])

Показатели	Группа контроля, n = 53 (1)	Группа пациентов с БК (до экспозиции с ПНЖК) n = 41 (2)	Группа пациентов с БК (после экспозиции с ПНЖК) n = 41 (3)	Критерий Манна-Уитни p	Критерий Краскела-Уоллиса p
Средний диаметр эритроцита, мкм	7,54 ± 0,07 7,52 [7,48; 7,56]	7,48 ± 0,04 7,46 [7,40; 7,50]	7,50 ± 0,05 7,50 [7,46; 7,52]	p > 0,1	0,711
Доля дискоцитов,%	74,3 ± 8,19 73 [70;81]	55,87 ± 17,83 61 [38;68]	60,42 ± 15,43 64 [42;70]	p1-2 0,00001 p1-3 0,0003	0,00001
Доля сфероцитов,%	18,83 ± 6,64 18 [13;23]	38,79 ± 18,11 33,5 [23;57]	34,81 ± 17,4 30 [24;44]	p1-2 0,00001 p1-3 0,00009	0,00001
Доля деформ. клеток,%	19,98 ± 7,34 18 [16;25]	55,3 ± 20,0 65 [49;70]	50,21 ± 18,5 55 [38;62]	p1-2 0,00001 p1-3 0,00001	0,00001
Измененный характер поверхности Er, усл. коэффициент	1,08 ± 0,27 1 [1;1]	1,75 ± 0,43 2 [2;2]	1,4 ± 0,48 1,5 [1;2]	p1-2 0,00001 p1-3 0,00001	0,00001
Амплитуда деформации на частоте 10 ⁶ Гц, м	8,15·10 ⁻⁶ ± 0,65·10 ⁻⁶ 8 [8;9]	6,27·10 ⁻⁶ ± 0,46·10 ⁻⁶ 6 [6;7]	6,76·10 ⁻⁶ ± 0,53·10 ⁻⁶ 6,5 [6;6,4]	p1-2 0,00001 p1-3 0,00001 p2-3 0,059	0,00001
Степень изменения амплитуды деформации на частоте 0,5 × 10 ⁶ Гц,%	75,38 ± 7,17 75 [69;81]	51,42 ± 9,74 52,5 [43;57]	59,32 ± 10,7 56 [48;58]	p1-2 0,00001 p1-3 0,00001 p2-3 0,063	0,00001
Обобщенный показатель жесткости, Н/м	6,49·10 ⁻⁶ ± 0,9·10 ⁻⁶ 7 [6;7]	9,42·10 ⁻⁶ ± 0,51·10 ⁻⁶ 9 [9;10]	8,78·10 ⁻⁶ ± 0,62·10 ⁻⁶ 8 [8,3;9,2]	p1-2 0,00001 p1-3 0,00001 p2-3 0,02	0,00001
Обобщенный показатель вязкости, Па с	0,57 ± 0,07 6 [5;6]	0,732 ± 0,034 7 [7;8]	0,691 ± 0,032 6,8 [6,5; 7,4]	p1-2 0,00001 p1-3 0,00001 p2-3 0,05	0,00001
Индекс агрегации Er, усл. коэффициент	0,40 ± 0,2 0 [0;0]	0,80 ± 0,7 0 [0;0]	0,63 ± 0,51 0 [0;0]	p > 0,1	0,674
Индекс деструкции Er при 10 ⁶ Гц,%	0,11 ± 0,45 0 [0;0]	0,77 ± 1,04 0 [0;0]	0,23 ± 0,13 0 [0;0]	p1-2 0,05 p1-3 0,01 p2-3 0,04	0,0374
Индекс деструкции Er при 0,5 × 10 ⁶ Гц,%	0,11 ± 0,34 0 [0;0]	0,74 ± 1,11 0 [0;0]	0,21 ± 0,11 0 [0;0]	p1-2 0,05 p1-3 0,008 p2-3 0,05	0,0453
Индекс деструкции Er при 0,1 × 10 ⁶ Гц,%	0,04 ± 0,3 0 [0;0]	0,65 ± 1,14 0 [0;0]	0,15 ± 0,10 0 [0;0]	p1-2 0,014 p1-3 0,005 p2-3 0,03	0,0017
Индекс деструкции Er при 0,5 × 10 ⁵ Гц,%	0,02 ± 0,1 0 [0;0]	0,72 ± 1,81 0 [0;0]	0,53 ± 0,24 0 [0;0]	p1-3 0,05 p2-3 0,054	0,0487
Поляри-зуюемость на частоте 10 ⁶ Гц, м ³	6,58·10 ⁻¹⁵ ± 2,07·10 ⁻¹⁵ 6 [5;8]	2,88·10 ⁻¹⁵ ± 0,97·10 ⁻¹⁵ 2,5 [2;3,2]	3,54·10 ⁻¹⁵ ± 1,11·10 ⁻¹⁵ 3 [2;4]	p1-2 0,00001 p1-3 0,00001 p2-3 0,001	0,00001
Поляри-зуюемость на частоте 0,5 × 10 ⁶ Гц, м ³	4,76·10 ⁻¹⁵ ± 2,35·10 ⁻¹⁵ 4[3;6]	1,78·10 ⁻¹⁵ ± 0,89·10 ⁻¹⁵ 1,5[1;2,3]	2,79·10 ⁻¹⁵ ± 1,09·10 ⁻¹⁵ 2,4[2;3,2]	p1-2 0,0001 p1-3 0,0001 p2-3 0,02	0,004
Поляри-зуюемость на частоте 0,1 × 10 ⁶ Гц, м ³	-3,59·10 ⁻¹⁵ ± 2,59·10 ⁻¹⁵ 2 [2;5]	-4,11·10 ⁻¹⁵ ± 1,61·10 ⁻¹⁵ 4 [3;5,4]	-3,37·10 ⁻¹⁵ ± 2,0·10 ⁻¹⁵ 3 [2;4]	p1-2 0,03 p2-3 0,05	0,03
Поляри-зуюемость на частоте 0,05 × 10 ⁶ Гц, м ³	-4,95·10 ⁻¹⁵ ± 2,12·10 ⁻¹⁵ 4 [4;6]	-4,28·10 ⁻¹⁵ ± 1,83·10 ⁻¹⁵ 3 [2;5]	-3,37·10 ⁻¹⁵ ± 1,92·10 ⁻¹⁵ 3 [1;4]	p1-2 0,02 p1-3 0,04 p2-3 0,05	0,05

Таблица 1 (продолжение). Электрические и вязкоупругие параметры эритроцитов пациентов с болезнью Крона в динамике эксперимента и обследуемых группы контроля ($M \pm SD$), ($Me [25\%; 75\%]$)

Показатели	Группа контроля, n = 53 (1)	Группа пациентов с БК (до экспозиции с ПНЖК) n = 41 (2)	Группа пациентов с БК (после экспозиции с ПНЖК) n = 41 (3)	Критерий Манна-Уитни p	Критерий Краскела-Уоллиса p
Относит. поляризуемость	0,93 ± 0,33 1 [1;1]	1,12 ± 0,51 1 [1;1]	1,42 ± 0,71 1 [1;2]	p > 0,1	0,09
Электропроводность, см/м	5,1·10 ⁻⁵ ± 0,54·10 ⁻⁵ 5 [5;5]	7,48·10 ⁻⁵ ± 1,38·10 ⁻⁵ 7 [6;9]	6,11·10 ⁻⁵ ± 1,22·10 ⁻⁵ 5,7 [5,3;7]	p1-2 0,00001 p1-3 0,00001 p2-3 0,03	0,00001
Емкость клеточной мембраны, Ф	7,26·10 ⁻¹⁴ ± 0,53·10 ⁻¹⁴ 7 [7;8]	5,27·10 ⁻¹⁴ ± 3,47·10 ⁻¹⁴ 5,5 [3;7]	6,24·10 ⁻¹⁴ ± 2,1·10 ⁻¹⁴ 6 [5,3;7,6]	p1-2 0,0008 p1-3 0,02 p2-3 0,013	0,003
Скорость движения E _г к электродам, мкм/с	7,75 ± 1,07 8 [7;8]	3,85 ± 0,9 4 [3;5]	4,51 ± 0,88 4,4 [3,8;5]	p1-2 0,00001 p1-3 0,00001 p2-3 0,02	0,00001
Равновесная частота, Гц	0,49·10 ⁶ ± 0,07·10 ⁶ 1 [0;1]	0,92·10 ⁶ ± 0,94·10 ⁶ 0,5 [0;1]	0,70·10 ⁶ ± 0,88·10 ⁶ 0,5 [0;1]	p > 0,1	0,754
Дипольный момент, Кл/м	7,59·10 ⁻²¹ ± 0,99·10 ⁻²¹ 8 [7;8]	4,44·10 ⁻²¹ ± 1,07·10 ⁻²¹ 4 [4;5]	5,22·10 ⁻²¹ ± 1,60·10 ⁻²¹ 4,6 [4,3;5,6]	p1-2 0,00001 p1-3 0,00001 p2-3 0,002	0,00001

в динамике (до и после экспозиции в течение 2 ч с омега-3 ПНЖК), а также уровни показателей эритроцитов у лиц группы сравнения.

Средний диаметр эритроцитов у пациентов с БК достоверно не отличался от лиц группы сравнения. При этом у пациентов с заболеваниями кишечника отмечено снижение доли дискоцитов при увеличении сфероцитов и доли деформированных эритроцитов.

Клетки пациентов с БК по сравнению с контрольной группой имели сниженную деформабельность на высоких частотах, обобщенные показатели вязкости и жесткости клеток оказались выше, чем в группе контроля (p < 0,00001).

Клетки красной крови пациентов с БК имели склонность к образованию агрегатов, однако степени достоверности различия не достигали. У пациентов с БК уровень гемолиза эритроцитов был достоверно выше на высоких (10⁶; 0,5 × 10⁶ Гц) и низких (10³ Гц) частотах (p = 0,014–0,05) по сравнению с контролем.

Показатель поляризуемости на всех частотах электрического поля оказался ниже у больных с болезнью Крона, чем у здоровых лиц (p=0,0001–0,02). Относительная поляризуемость имела тенденцию к повышению у больных с БК.

Электропроводность мембран эритроцитов была выше у пациентов с БК по сравнению с контролем (p < 0,00001). Клетки красной крови пациентов с болезнью Крона имели более низкие уровни емкости мембран, чем лица группы сравнения (p = 0,0008). Скорость движения эритроцитов к электродам, как и величина дипольного момента, у пациентов с БК была достоверно ниже, чем у лиц контрольной группы (p < 0,00001).

Равновесная частота — это частота неоднородного переменного электрического поля, на которой электрическая проводимость клетки совпадает с проводимостью окружающей клетку среды. Смещение данного показателя в низко- и высокочастотные диапазоны свидетельствует о выраженных изменениях структуры мембран (например, появление пор, электрических пробоев) и состава электролитов внутри клеток [16]. Равновесная частота у пациентов с БК имела тенденцию к смещению в высокочастотный диапазон по сравнению с лицами контрольной группы.

После экспозиции с растворами ПНЖК в течение 2 часов параметры клеток красной крови были повторно исследованы с использованием метода диэлектродиффузии.

По сравнению с начальными значениями установлено увеличение среднего диаметра клеток, доли

дискоцитарных форм при снижении сфероцитарных, деформированных с измененным характером поверхности, но в виде тренда без уровня достоверности. Отмечена тенденция к увеличению амплитуды деформации эритроцитов на высоких частотах электрического поля 10^6 и 5×10^6 Гц ($p=0,059-0,063$). Уровни обобщенных показателей вязкости и жесткости клеток оказались достоверно ниже после воздействия ПНЖК по сравнению с исходными ($p<0,05$ и $p=0,02$, соответственно). Отмечен тренд к снижению индекса агрегации клеток, однако, без уровня достоверности из-за большой дисперсии значений. Выявлено достоверное снижение уровня гемолиза на всех частотах электрического поля ($p=0,03-0,054$) на фоне повышения уровней показателей поляризуемости ($p=0,001-0,05$) после экспозиции эритроцитов с эйкозапентаеновой и докозагексаеновой жирными кислотами. Показатель относительной поляризуемости выявил лишь тенденцию к увеличению. Отмечен тренд к смещению равновесной частоты в низкочастотный диапазон.

Выявлено достоверное увеличение скорости движения клеток к электродам ($p=0,02$) и величины дипольного момента ($p=0,002$) после воздействия ПНЖК по сравнению с начальными значениями. Установлено снижение электропроводности ($p=0,03$) и увеличение емкости клеток ($p=0,013$) в ходе проведения эксперимента.

Таким образом, после экспозиции с омега-3 ПНЖК выявлены положительные сдвиги в уровнях электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов, свидетельствующие о повышении их способности к деформации, увеличении поверхностного заряда и изменении структуры мембран.

Обсуждение

Исследования, связанные с оценкой влияния ПНЖК на клетки красной крови, проводились в 80–90 гг. и были связаны, преимущественно с экспериментами на добровольцах, которым на определенный срок назначали пищевые добавки, содержавшие ПНЖК, после чего оценивались параметры эритроцитов. В ходе выполнения целого ряда работ было установлено снижение образования агрегатов, повышение способности клеток красной крови к деформации после регулярного потребления пищевых эйкозапентаеновой, докозагексаеновой ПНЖК [19, 20]. Bruckner G. et al. обнаружили значительное увеличение скорости капиллярного кровотока после приема добавок с рыбьим жиром [21]. Djemli-Shipkolye A. et al. показали, что диетическая докозагексаеновая кислота вызывала значительное повышение активности Na, K-АТФазы, Mg-АТФазы эритроцитов посредством изменения соотношения оме-

га-3 и омега-6 ПНЖК в их мембранах [22]. Popp-snijders C. et al. оценивая эффект воздействия добавки, содержащей 3 г ПНЖК, в течение 4 недель, обнаружили увеличение индекса ненасыщенности фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина мембран эритроцитов и снижение вязкости суспензии клеток красной крови, отражающее их повышенную деформируемость [20]. С повышением способности клеток красной крови к деформации под влиянием пищевых омега-3 ПНЖК Fougère B. et al. связали повышение физической работоспособности добровольцев [23]. Другие авторы отметили, что повышенная деформируемость эритроцитов является следствием включения омега-3 ПНЖК в фосфолипиды мембран эритроцитов [24]. Mills D.E. et al. описано влияние пищевых омега-3 полиненасыщенных жирных кислот на возрастные изменения транспорта анионов эритроцитов и восприимчивость к клеткам к окислительному повреждению за счет образования свободных радикалов [25].

Экспериментальные работы *in vitro*, позволяющие оценить эффект ПНЖК, проводились преимущественно на культурах клеток (раковые линии) для выявления влияния ЖК на пролиферацию и апоптоз раковых клеток [17, 18], для установления воздействия ПНЖК на мембраны кардиомиоцитов в связи с их антиаритмическим эффектом [26, 27]. Исследования на клетках красной крови *in vitro* в связи с эффектами омега-3 ПНЖК единичны и неоднозначны по полученным результатам [28, 29].

Длинноцепочечные омега-3 ПНЖК выполняют целый ряд физиологических функций, которые связаны с их ролью в структуре фосфолипидов клеточных мембран, в производстве эйкозаноидов, в формировании мембранных сигнальных платформ, называемых «плотами», или «рафтами» [30]. Описываемые эффекты тесно связаны с изменением электрических, функциональных параметров клеток, в том числе, эритроцитов.

Жирные кислоты в фосфолипидах клеточных мембран играют важную роль в обеспечении оптимальной среды для функционирования мембранных белков [31], поддержания порядка (текучести) мембран [32] и влияния на формирование липидного плота [33]. Вторичные мессенджеры, такие как диацилглицерин, образуются путем катализируемого ферментами гидролиза мембранных фосфолипидов; состав жирных кислот таких вторичных мессенджеров, который определяется составом фосфолипида-предшественника, может влиять на их активность [34]. Кроме того, мембранные фосфолипиды являются субстратами для высвобождения незтерифицированных ПНЖК; высвобожденные ПНЖК могут действовать как сигнальные молекулы, лиганды (или предшественники лигандов) для факторов транс-

крипции, таких как PPAR, или предшественники для биосинтеза липидных медиаторов, которые участвуют в регуляции многих клеточных и тканевых реакций.

Показано, что длинноцепочечные омега-3 ПНЖК снижают доступность арахидоновой кислоты в качестве субстрата для синтеза провоспалительных, прокоагулянтных эйкозаноидов, а также ингибируют метаболизм арахидоновой кислоты, поскольку конкурируют с омега 6 ПНЖК в качестве субстрата для целого ряда ферментов, включая элонгазы, десатуразы, циклооксигеназы, липоксигеназы [35]. Из эйкозапентаеновой и докозагексаеновой ПНЖК синтезируется целый ряд липидных медиаторов, в том числе, резольвинов и протектинов с высоким противовоспалительным, иммуномодулирующим, нейропротекторным потенциалом [36–38].

Особый интерес вызывает влияние ПНЖК на состояние мембранных плотов. Липидные рафты — это подобласти клеточных мембран. Они имеют четкий, характерный состав, будучи богатыми сфинголипидами и холестерином, а боковые цепи присутствующих фосфолипидов обычно сильно обогащены насыщенными жирными кислотами по сравнению с окружающими нерафинированными областями мембраны [39]. Многие белки, участвующие в передаче сигналов, преимущественно находятся в липидных плотках, которые, по-видимому, действуют как сигнальные платформы, объединяя различные сигнальные компоненты в ответ на стимул, тем самым облегчая их взаимодействие [39]. Исследования *in vitro* и на животных показывают, что омега-3 ПНЖК модулируют структуру и состав липидных плотов в иммунных клетках, вытесняя ключевые сигнальные белки и изменяя внутриклеточный транспорт белка [40–43].

В последние годы установлено, что ПНЖК разжижают не только упорядоченные липидные рафты в мембранах клеток, значимые для активности мембранных ферментов, но и воздействуют на жидкую неупорядоченную фазу мембран [44]. de Santis A. et al. показали, что ДГК влияет на функцию клеточной мембраны и связанных с ней белков через косвенный механизм действия, основанный на влиянии ДГК-фосфолипидов на структуру липидного бислоя. По данным Stephen R. et al. ацильные цепи ДГК фосфатидилхолина регулируют размер липидных рафтов, что имеет потенциальные последствия для сигнальных сетей, которые ассоциированы с компартиментализацией белков внутри и вне рафтов [45].

После изучения влияния ДГК на молекулярную организацию в модельных мембранах и интактных плазматических мембранах клеток млекопитающих был

сделан вывод о том, что неупорядоченные липиды, содержащие ДГК, повышают стабильность упорядоченных плотов за счет увеличения разницы в порядке между плотом и не плотовыми средами [46]. Однако механизм, с помощью которого ДГК способствует образованию более крупных доменов, еще не ясен. Есть две точки зрения по данному вопросу. Согласно одному сценарию, богатые ДГК не рафтовые области истончаются за счет увеличения площади поперечного сечения, которое сопровождается большим беспорядком, заставляя рафты расти для уменьшения натяжения линий, что связано с усиленным гидрофобным несоответствием. Альтернативный сценарий связывает увеличенный размер рафта с большей разницей в порядке между доменами рафта и не рафтами [47].

Поскольку эритроциты лишены ядра, в настоящем эксперименте следует принимать во внимание преимущественное воздействие ПНЖК на мембрану эритроцита. Основными вероятными механизмами действия омега-3 ПНЖК на клетки красной крови следует считать влияние на мембранные белки-рецепторы, трансмембранные белки — ионные каналы, а также модуляцию липидных рафтов в мембране.

Поскольку большая часть трансмембранных белков является вискозизависимыми, значительная часть из них выполняет транспортные функции [48], как было показано ранее, под влиянием омега-3 ПНЖК изменяется их активность. Действительно, данный эффект был показан для Na, K-АТФазы, Mg-АТФазы [22], калиевого канала, активируемого кальцием [49]. Механическая стимуляция эритроцитов активирует механочувствительные каналы, скорее всего, Piezo1. Эта активность канала позволяет Ca²⁺ проникать в клетку, что приводит к временной активации канала Gardos, связанному с K⁺, Cl⁻ и потерей воды, то есть с переходной адаптацией объема, облегчающей прохождение эритроцитов через сужение [50]. Hoshi T. et al. убедительно показали, что ДГК с EC50 ~ 500 нМ быстро и обратимо активирует вольтаж-активируемые K⁺ каналы, состоящие из порообразующей субъединицы Slo1 и вспомогательной субъединицы β1, увеличивая ток в ~ 20 раз. Действие ДГК не требует активации датчика напряжения или связывания Ca²⁺, но включает дестабилизацию закрытой конформации ворот ионной проводимости. Таким образом, показано, что каналы Slo1 BK являются рецепторами для длинноцепочечных жирных кислот омега-3, и эти жирные кислоты активируют K⁺ каналы [49].

Данные обстоятельства значимы для функционального состояния эритроцитов. Активация магний зависимой Na⁺, K⁺-АТФазы эритроцитов под влиянием ПНЖК ассоциирована с активным гидролизом АТФ, что сказывается на морфологии клеток — поддержании диско-

цитарной формы. Повышенные уровни деформированных, сфероцитарных форм эритроцитов у пациентов с БК в начале эксперимента косвенно свидетельствуют о дефиците внутриклеточного АТФ [9]. Показано, что АТФ-зависимая быстрая трансмембранная миграция аминофосфолипидов заметно замедляется в клетках, дефицитных по АТФ, что нарушает поддержание мембранной асимметрии фосфолипидов клеточных мембран [48]. Влияние ПНЖК в настоящем эксперименте, вероятно, приводит к существенному изменению структуры мембран эритроцитов, что сказывается на активности мембрано-связанных ферментов и энергетическом потенциале эритроцитов.

Плотность поверхностного заряда эритроцитов на 60% определяется содержанием в мембране сиаловых и нейраминовой кислот (связанных с гликопротеинами и гликолипидами мембран) [51]. Доказан факт связи структуры гликанов мембран с функцией Na^+ , K^+ -АТФазы [52]. Снижение АТФ-азной активности сказывается на транспорте ионов через клеточную мембрану. Это, в свою очередь, также влияет на уровень заряда мембран клеток, поскольку известно, что клеточный потенциал зависит от концентрации электролитов во внутри- и внеклеточной среде [51, 53]. Можно предположить, что повышение активности фермента под влиянием ПНЖК ассоциировано с увеличением поверхностного заряда эритроцитов, который отражается такими показателями как скорость движения клеток к электродам и дипольный момент. Известно, что на заряд эритроцитов влияют крупномолекулярные белки сыворотки крови, которые способны адсорбироваться на мембране эритроцитов независимо от их антигенной структуры [9, 51]. Уровни маркеров воспаления (фибрин, фибриноген, С-реактивный белок, ферритин и др.) существенно повышены при обострении БК [12], что, вероятно, является одной из причин сниженного отрицательного заряда клеток. В ходе проведения эксперимента отмечено достоверное увеличение скорости движения клеток к электродам, дипольного момента. Возможно, омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты модифицируют структуру мембран эритроцитов с увеличением ее площади, изменяют межмолекулярные взаимодействия, в том числе, с белками, «экранирующими» поверхностный заряд эритроцитов, что объясняет наблюдаемые позитивные сдвиги этих электрических параметров клетки.

Известно, что постоянство состава внутри- и внеклеточной жидкости, ионный состав способствуют поддержанию двояковогнутой формы эритроцита, что ведет к стабильному дзета-потенциалу клетки [9, 51, 53]. Становится очевидной взаимосвязь между снижением электрического заряда эритроцита при БК и изменением формы и размеров клеток, что отчасти нивелируется под влиянием омега-3 ПНЖК.

При снижении электрического заряда клеток красной крови, наблюдаемом у пациентов с БК, силы отталкивания между клетками уменьшаются, барьер устраняется, и, вследствие действия сил притяжения, клетки образуют агрегаты [51]. Повышенное образование агрегатов в период обострения воспалительных заболеваний кишечника описано и согласуется с результатами настоящего исследования [54, 55]. Следствием увеличения заряда клеток после экспозиции с омега-3 ПНЖК является снижение индекса агрегации.

Показано, что сниженный заряд эритроцитов уменьшает их стабильность [51, 53]. Одним из параметров, отражающих биологическую активность эритроцитов, их резистентностью к воздействиям внешних факторов, является поляризуемость на разных частотах электрического поля при исследовании клеток методом диэлектрофореза [16]. Сниженные уровни поляризуемости у пациентов с БК свидетельствуют о недостаточной функциональной активности клеток. Следует иметь в виду, что у большей части пациентов с БК выявлено наличие анемии хронических заболеваний, предполагающей влияние высоких уровней гепсидина, целого ряда провоспалительных цитокинов (интерлейкин-6, ФНО- α), снижение уровня эритропоэтина [56], что в значительной степени сказывается на электрических и вязкоупругих параметрах эритроцитов [12, 14], прежде всего на поляризуемости. Данный параметр очень чувствителен к воздействию на клетку внешних факторов, его изменение происходит в короткие сроки и ассоциировано с пространственным перераспределением электрических зарядов эритроцита. Следует отметить, что одними из наблюдаемых эффектов воздействия ПНЖК на эритроциты оказались повышение уровней поляризуемости на всех частотах электрического поля, тенденция к увеличению относительной поляризуемости, отражающей расширение диапазона, большую степень адаптации клетки к изменяющимся условиям окружающей среды. Вероятно, структурные изменения мембран, изменение заряда, условий функционирования мембрано-связанных ферментных систем под влиянием омега-3 ПНЖК значимы для показателя поляризуемости эритроцита.

Повышение резистентности эритроцитов ассоциировано со снижением их склонности к гемолизу, что наблюдалось в нашей работе в динамике экспозиции эритроцитов с ПНЖК. Использование разных частот электрического поля обусловлено моделированием воздействия факторов разной интенсивности на клетки (на высоких частотах электрического поля — действие на мембрану и внутреннее содержимое клетки; на низких — только на мембраны). Снижение лизиса клеток на всех частотах поля — свидетельство вероятного влияния ПНЖК не только на мембранные струк-

туры, но и опосредованно — на состояние гемоглобина. Известно о наличии «сшивок» между внутренней структурой мембран и гемоглобином, что существенно повышает обобщенную жесткость эритроцитов [57]. Модификация ПНЖК не только наружной, но и внутренней поверхности мембран эритроцитов, вероятно, приводит к уменьшению количества таких «сшивок», что сказывается на резистентности клеток, обобщенном показателе жесткости.

Эффект встраивания ПНЖК в мембранные фосфолипиды эритроцитов приводит к снижению жесткости и вязкости мембран, как следствие, их обобщенных показателей. Данный аспект, вероятно, является одним из факторов, влияющих на способность клеток к деформации — в настоящей работе отмечена тенденция к увеличению амплитуды деформации на высоких частотах электрического поля. Деформируемость является функцией структурных элементов белков цитоскелета, процессов, контролируемых уровнями внутриклеточных ионов и воды, а также отношения поверхности мембраны к объему [58]. Учитывая прямое и косвенное влияние омега-3 ПНЖК на все факторы, определяющие способность клеток к деформации, наблюдаемый в настоящем исследовании тренд к повышению деформабельности эритроцитов вполне объясним. В клиническом аспекте наблюдаемый эффект омега-3 ПНЖК на деформируемость эритроцитов является весьма важным. Эритроциты деформируются в ответ на напряжение сдвига в кровообращении, что способствует их эффективному прохождению через капилляры. Клетки красной крови также экспортируют вазоактивные медиаторы в ответ на деформацию и другие физиологические и патологические раздражители. Дезоксигенирование эритроцитарного гемоглобина приводит к экспорту сосудорасширяющих и антиагрегивных S-нитрозотиолов (SNOs) и аденозинтрифосфата (АТФ) параллельно с переносом кислорода в дыхательном цикле. Вместе эти опосредованные реакции на напряжение сдвига и разгрузку кислорода способствуют эффективному потоку клеток крови и, в свою очередь, оптимизируют доставку кислорода [59]. Следовательно, потенциальные эффекты омега-3 ПНЖК на реологические параметры следует считать значимыми для пациентов с БК, у которых отмечены выраженные сдвиги в системе гемостаза [54, 55].

Воздействие ПНЖК на ионные каналы имеет существенное значение для способности мембраны проводить электрический ток, о чем свидетельствуют работы, проведенные на клетках сетчатки глаза [60], кардиомиоцитах [26]. В настоящей работе снижение электропроводности на фоне увеличения емкости мембран косвенно свидетельствует о наличии такого воздействия и на эритроциты. Вероятно, избыточное образование

пор в мембране [61] у пациентов с БК в стадии обострения на фоне высоких уровней эйкозаноидов — производных арахидоновой кислоты (простагландины E2 и D2, тромбоксан B2, лейкотриен B4) снижается после экспозиции с омега-3 ПНЖК в связи с конкурентными отношениями омега-3 и омега-6 ПНЖК за общие ферментные системы [35]. Снижение толщины мембраны, отражаемые более высокими уровнями емкости, вероятно обусловлено встраиванием ПНЖК в мембраны и ее модификацией с истончением, что показано в исследованиях по изучению липидных плотов мембран [39, 43].

Показатель равновесной частоты является параметром, зависимым от ионного состава вне- и внутриклетки [16]. Тенденция к сдвигу его в низкочастотный диапазон, очевидно, отражает активацию работы трансмембранных насосов под воздействием омега-3 ПНЖК.

Заключение

Таким образом, эритроциты пациентов с болезнью Крона в стадии обострения отличались от эритроцитов лиц контрольной группы увеличением количества сфероцитарных, деформированных форм клеток с измененной поверхностью при снижении доли дискоцитов. Амплитуда деформации клеток на высоких частотах у больных с БК оказалась ниже на фоне повышенных обобщенных показателей вязкости и жесткости. У пациентов с БК эритроциты имели склонность к образованию агрегатов и деструкции на разных частотах электрического поля. Поляризуемость на частотах 10^6 , $0,5 \times 10^6$, 10^5 Гц оказалась ниже, а на частоте ($0,5 \times 10^4$) Гц и относительная поляризуемость — выше при наличии воспалительных заболеваний кишечника по сравнению с группой контроля. Эритроциты пациентов с болезнью Крона имели более высокие уровни электропроводности и более низкие — емкости мембран, скорости движения к электродам, дипольного момента, чем в контроле. Равновесная частота у пациентов с ВЗК оказалась смещенной в высокочастотный диапазон.

Экспозиция эритроцитов пациентов с болезнью Крона *in vitro* в течение 2 часов растворами эйкозапентаеновой и докозагексаеновой кислот привела к достоверному изменению электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов: снижению обобщенных показателей жесткости, вязкости клеток, электропроводности, индексов агрегации и деструкции на всех частотах электрического поля, повышению уровней емкости, дипольного момента, скорости движения клеток к электродам, поляризуемости ($p=0,001-0,05$). Выявлены тенденции к увеличению диаметра эритроцитов, амплитуды деформации клеток на высоких

частотах электрического поля, доли дискоцитарных форм при снижении сфероцитарных, деформированных. Отмечен тренд к смещению равновесной частоты в низкочастотный диапазон. Наблюдаемые изменения электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов, вероятно, обусловлены модификацией структуры мембран (мембранных сигнальных платформ) под воздействием омега-3 полиненасыщенных жирных кислот, изменением активности мембранных белков — рецепторов и ферментов, выполняющих транспортные функции, и косвенным влиянием на цитозоль клетки.

Выявленные эффекты омега-3 ПНЖК на электрические и вязкоупругие параметры эритроцитов у паци-

ентов с болезнью Крона в стадии обострения свидетельствуют о возможной перспективе использования омега 3 ПНЖК в качестве дополнительных средств для индукции и поддержания ремиссии при данном заболевании.

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, Рег. № АА-АА-А17–117112850280–2.

ЛИТЕРАТУРА

1. Thia KT, Sandborn WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Loftus EV. Risk factors associated with progression to intestinal complications of Crohn's disease in a population-based cohort. *Gastroenterology* 2010; 139: 1147–55.
2. Peyrin-Biroulet L, Loftus EV, Colombel JF, Sandborn WJ. The natural history of adult Crohn's disease in population-based cohorts. *Am J Gastroenterol* 2010; 105: 289–97.
3. Uchiyama K., Nakamura M., Odahara S., Koido S., Katahira K., Shiraishi H., Ohkusa T., Fujise K., Tajiri H. N-3 polyunsaturated fatty acid diet therapy for patients with inflammatory bowel disease // *Inflamm Bowel Dis*. 2010. Vol. 16. No. 10. P. 1696–707.
4. Uchiyama K., Odahara S., Nakamura M., Koido S., Katahira K., Shiraishi H., Ohkusa T., Fujise K., Tajiri H. The fatty acid profile of the erythrocyte membrane in initial-onset inflammatory bowel disease patients // *Dig. Dis. Sci.* — 2013. — Vol. 58. -P. 1235–1243.
5. 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.
6. Friedman A.N., Yu Z., Tabbey R., Denski C., Tamez H., Wenger J., Thadhani R.Y., Watkins B.A. Low blood levels of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids in US hemodialysis patients: clinical implications // *Am.J. Nephrol.* — 2012. — Vol. 36. — P. 451–458.
7. Кручинина М.В., Светлова И.О., Азгалдян А.В., Осипенко М.Ф., Валуйских Е.Ю., Шашков М.В., Соколова А.С., Кручинин В.Н., Яковина И.Н., Осипенко И.В. Профиль жирных кислот мембран эритроцитов и сыворотки крови у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника в зависимости от стадии заболевания // *Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия: Естественные и технические науки*. — 2021. — № 5. — с. 161–184. DOI 10.37882/2223–2966.2021.05.18
8. 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;(10):46–55. <https://doi.org/10.31146/1682–8658-ecg-182–10–46–55>
9. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А. Физиология и патофизиология эритроцита. Томск: Изд-во Томск. ун-та, 2004. 202 с.
10. Зинчук В.В. Деформируемость эритроцитов: физиологические аспекты. // *Успехи физиологических наук*, 2001, том 32, № 3, с. 66–78
11. Курилович С.А., Кручинина М.В., Громов А.А., Генералов В.М., Бакиров Т.С., Рихтер В.А., Семенов Д.В. Обоснование применения эссенциальных фосфолипидов при хронических заболеваниях печени: динамика электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов // *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. — Москва. — 2010. — № 11. — С. 46–52.
12. Кручинина М.В., Светлова И.О., Азгалдян А.В., Осипенко М.Ф., Валуйских Е.Ю., Громов А.А., Генералов В.М., Кручинин В.Н., Яковина И.Н. Особенности электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов при воспалительных заболеваниях кишечника. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2021;189(5): 19–30. DOI: 10.31146/1682–8658-ecg-189–5–19–30
13. Кручинина М.В., Светлова И.О., Азгалдян А.В., Осипенко М.Ф., Валуйских Е.Ю., Громов А.А., Генералов В.М., Кручинин В.Н., Яковина И.Н., Осипенко И.В. Способ диагностики активности воспалительных заболеваний кишечника, основанный на совокупности электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов и уровне фекального кальпротектина. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2021;190(6): 40–49. DOI: 10.31146/1682–8658-ecg-190–6–40–49
14. Кручинина М.В., Светлова И.О., Азгалдян А.В., Громов А.А., Генералов В.М., Яковина И.Н., Шестов А.А. Электрические и вязкоупругие параметры эритроцитов как предикторы обострения при воспалительных заболеваниях кишечника. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2021; 41 (5): 96–113.
15. Клинические рекомендации по диагностике и лечению болезни Крона у взрослых (Проект). *Колопроктология*. 2020; 19 (2): 8–38. URL: <https://doi.org/10.33878/2073–7556–2020–19–2–8–38>
16. Генералов В.М., Кручинина М.В., Дурыманов А.Г., Медведев А.А., Сафатов А.С., Сергеев А.Н., Буряк Г.А., Курилович С.А., Громов А.А. Диэлектрофорез в диагностике инфекционных и неинфекционных заболеваний. Новосибирск: ЦЭРИС, 2011. 172 с.

17. Habermann N, Lund EK, Pool-Zobel BL, Gleit M. 2009. Modulation of gene expression in eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid treated human colon adenoma cells. *Genes Nutr.* 4:73–76.
18. Toit-Kohn JL, Louw L, Engelbrecht AM. 2009. Docosahexaenoic acid induces apoptosis in colorectal carcinoma cells by modulating the PI3 kinase and p38MAPK pathways. *J Nutr Biochem.* 20:106–114.
19. Cartwright IJ, Pockley AG, Galloway JH, Greaves M, Preston FE. The effects of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids on erythrocyte membrane phospholipids, erythrocyte deformability and blood viscosity in healthy volunteers. *Atherosclerosis.* 1985 Jun;55(3):267–81. doi: 10.1016/0021-9150(85)90106-6. PMID: 4015748.
20. Popp-snijders C., Schouten J.A., van der Meer J., van der Veen E.A. Fatty fish-induced changes in membrane lipid composition and viscosity of human erythrocyte suspensions. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* Volume 46, 1986 — Issue 3 Pages 253–258
21. Bruckner G, Webb P, Greenwell L, Chow C, Richardson D. Fish oil increases peripheral capillary blood cell velocity in humans. *Atherosclerosis.* 1987 Aug;66(3):237–45. doi: 10.1016/0021-9150(87)90067-0. PMID: 3632762.
22. Djemli-Shipkolye A, Raccach D, Pieroni G, Vague P, Coste TC, Gerbi A. Differential effect of omega3 PUFA supplementations on Na, K-ATPase and Mg-ATPase activities: possible role of the membrane omega6/omega3 ratio. *J Membr Biol.* 2003 Jan 1;191(1):37–47. doi: 10.1007/s00232-002-1039-z. PMID: 12532275.
23. Fougère B, Goisser S, Cantet C, Soriano G, Guyonnet S, De Souto Barreto P, Cesari M, Andrieu S, Vellas B; MAPT Study Group. Omega-3 fatty acid levels in red blood cell membranes and physical decline over 3 years: longitudinal data from the MAPT study. *Geroscience.* 2017 Aug;39(4):429–437. doi: 10.1007/s11357-017-9990-x.
24. Andersson A, Nälsén C, Tengblad S, Vessby B. Fatty acid composition of skeletal muscle reflects dietary fat composition in humans. *Am J Clin Nutr.* 2002 Дек.; 76(6):1222–9. doi: 10.1093/ajcn/76.6.1222.
25. Mills DE, Murthy M, Galey WR. Dietary fatty acids, membrane transport, and oxidative sensitivity in human erythrocytes. *Lipids.* 1995 Jul;30(7):657–63. doi: 10.1007/BF02537003.
26. Xiao YF, Sigg DC, Leaf A. The antiarrhythmic effect of n-3 polyunsaturated fatty acids: modulation of cardiac ion channels as a potential mechanism. *J Membr Biol* 2005;206:141–54.
27. Lee KW, Lip GY. The role of omega-3 fatty acids in the secondary prevention of cardiovascular disease. *QJM* 2003;96:465–80.
28. van den Berg JJ, de Fouw NJ, Kuypers FA, Roelofsens B, Houtsmuller UM, Op den Kamp JA. Increased n-3 polyunsaturated fatty acid content of red blood cells from fish oil-fed rabbits increases in vitro lipid peroxidation, but decreases hemolysis. *Free Radic Biol Med.* 1991;11(4):393–9. doi: 10.1016/0891-5849(91)90156-w.
29. J.G. Bieri, R.K.H. Poukka, In Vitro Hemolysis as Related to Rat Erythrocyte Content of α -Tocopherol and Polyunsaturated Fatty Acids, *The Journal of Nutrition*, Volume 100, Issue 5, May 1970, Pages 557–564, <https://doi.org/10.1093/jn/100.5.557>
30. Calder PC. Mechanisms of action of (n-3) fatty acids. *J Nutr.* 2012 Mar;142(3):592S-599S. doi: 10.3945/jn.111.155259.
31. Murphy MG. Dietary fatty acids and membrane protein function. *J Nutr Biochem.* 1990;1:68–79.
32. Stubbs CD, Smith AD. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. *Biochim Biophys Acta.* 1984;779:89–137.
33. Yaqoob P. The nutritional significance of lipid rafts. *Annu Rev Nutr.* 2009;29:257–82.
34. Miles EA, Calder PC. Modulation of immune function by dietary fatty acids. *Proc Nutr Soc.* 1998;57:277–92.
35. Serhan CN, Clish CB, Brannon J, Colgan SP, Chiang N, Gronert K. Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. *J Exp Med.* 2000;192:1197–204.
36. Serhan CN, Hong S, Gronert K, Colgan SP, Devchand PR, Mirick G, Moussignac R-L. Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter pro-inflammation signals. *J Exp Med.* 2002;196:1025–37.
37. Serhan CN, Chiang N, van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:349–61.
38. Bazan NG. Cellular and molecular events mediated by docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 signaling in photoreceptor cell survival and brain protection. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2009;81:205–11.
39. Pike LJ. Lipid rafts: bringing order to chaos. *J Lipid Res.* 2003;44:655–67.
40. Chapkin RS, Wang N, Fan YY, Lupton JR, Prior IA. Docosahexaenoic acid alters the size and distribution of cell surface microdomains. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1778:466–71.
41. Kim W, Fan YY, Barhoumi R, Smith R, McMurray DN, Chapkin RS. n-3 Polyunsaturated fatty acids suppress the localization and activation of signaling proteins at the immunological synapse in murine CD4+ T cells by affecting lipid raft formation. *J Immunol.* 2008;181:6236–43.
42. Shaikh SR, Rockett BD, Salameh M, Carraway K. Docosahexaenoic acid modifies the clustering and size of lipid rafts and the lateral organization and surface expression of MHC class I of EL4 cells. *J Nutr.* 2009;139:1632–9.
43. Rockett BD, Franklin A, Harris M, Teague H, Rockett A, Shaikh SR. Lipid raft organization is more sensitive to disruption by (n-3) PUFA than nonrafts of EL4 and B Cells. *J Nutr.* 2011;141:1041–8.
44. de Santis A, Vitiello G, Appavou MS, Scoppola E, Fragneto G, Barnsley LC, Clifton LA, Ottaviani MF, Paduano L, Russo Krauss I, D’Errico G. Not just a fluidifying effect: omega-3 phospholipids induce formation of non-lamellar structures in biomembranes. *Soft Matter.* 2020 Dec 14;16(46):10425–10438. doi: 10.1039/d0sm01549k.
45. Stephen R. Wassall, Xiaoling Leng, Samuel W. Canner, Edward Ross Pennington, Jacob J. Kinnun, Andres T. Cavazos, Sahil Dadoo, Dylan Johnson, Frederick A. Heberle, John Katsaras, Saame Raza Shaikh, Docosahexaenoic acid regulates the formation of lipid rafts: A unified view from experiment and simulation, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Biomembranes*, Volume 1860, Issue 10, 2018, Pages 1985–1993, ISSN0005–2736, <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2018.04.016>.

46. Levental KR, Lorent JH, Lin X, Skinkle AD, Surma MA, Stockenbojer EA, Gorfe AA, Levental I. Polyunsaturated lipids regulate membrane domain stability by tuning membrane order. *Biophys J*. 2016;110:1800–1810.
47. Wassall SR, Leng X, Canner SW, Pennington ER, Kinnun JJ, Cavazos AT, Dadoo S, Johnson D, Heberle FA, Katsaras J, Shaikh SR. Docosahexaenoic acid regulates the formation of lipid rafts: A unified view from experiment and simulation. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2018 Oct;1860(10):1985–1993. doi: 10.1016/j.bbamem.2018.04.016.
48. Геннис Р. Биомембраны: Молекулярная структура и функции / М.: Мир. 1997. 624 с.
49. Hoshi T, Wissuwa B, Tian Y, et al. Omega-3 fatty acids lower blood pressure by directly activating large-conductance Ca²⁺-dependent K⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(12):4816–4821. doi:10.1073/pnas.1221997110
50. Danielczok JG, Terriac E, Hertz L, Petkova-Kirova P, Lautenschläger F, Laschke MW, Kaestner L. Red Blood Cell Passage of Small Capillaries Is Associated with Transient Ca²⁺-mediated Adaptations. *Front Physiol*. 2017 Dec 5;8:979. doi: 10.3389/fphys.2017.00979.
51. Шифман Ф. Дж. Патология физиологии крови. — Пер с англ. Жибурта Е.Б., Токарева Ю.Н. — М.-СПб.: «Издательство БИНОМ» — «Невский диалог». — 2000. — 448 с.
52. Nakomori SI. Structure and function of glycosphingolipids and sphingolipids: recollections and future trends. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1780(3):325–346. doi:10.1016/j.bbagen.2007.08.015
53. Исследование системы крови в клинической практике. // Под ред. Козинца Г.И., Макарова В.А. — М.: Изд-во «Трида-Х». — 1997. — 480 с.
54. Owczarek D., Cibor D., Głowacki M.K., Rodacki T., Mach T. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathology and risk factors for hypercoagulability. // *World J Gastroenterol*. — 2014. — Vol. 7. — No. 20(1). — P. 53–63. doi: 10.3748/wjg.v20.i1.53
55. Zezos P., Kouklakis G., Saibil F. Inflammatory bowel disease and thromboembolism // *World J Gastroenterol*. — 2014. — Vol. 20. — No. 38. — P. 13863–78. doi:10.3748/wjg.v20.i38.13863
56. Testa A., Rispo A., Romano M., Riegler G., Selvaggi F., Bottiglieri E., Martorano M., Rea M., Gravina A., Nardone O.M., Patturelli M., Pellino G., Miranda A., Caporaso N., Castiglione F. The burden of anaemia in patients with inflammatory bowel diseases // *Digestive and Liver Disease*. — 2016. — V. 48. — 267–70.
57. Гемоглобинопатии и талассемические синдромы. Под ред. А.Г. Румянцева, Ю.Н. Токарева, Н.С. Сметаниной. — Изд. «Практическая медицина». — М. — 2015. — 448 с.
58. Huisjes R, Bogdanova A, van Solinge WW, Schiffelers RM, Kaestner L, van Wijk R. Squeezing for Life — Properties of Red Blood Cell Deformability. *Front Physiol*. 2018 Jun 1;9:656. doi: 10.3389/fphys.2018.00656.
59. McMahon TJ. Red Blood Cell Deformability, Vasoactive Mediators, and Adhesion. *Front Physiol*. 2019 Nov 15;10:1417. doi: 10.3389/fphys.2019.01417.
60. Jeffrey BG, Weisinger HS, Neuringer M, et al. The role of docosahexaenoic acid in retinal function. *Lipids* 2001;36:859–71.
61. Генералов В.М., Бакиров Т.С., Дурыманов А.Г., Пак А.В., Сухенко Е.П., Кручинина М.В., Курилович С.А., Андреева И.С., Печуркина Н.И. Теоретическое и экспериментальное исследование влияния пор мембраны на амплитудно-частотную зависимость поляризуемости клетки // *Биофизика*. — 2008. — N53. — Выпуск 5. — С. 810–816.

© Кручинина Маргарита Витальевна (kruchmargo@yandex.ru), Громов Андрей Александрович (gromov.center@rambler.ru),
 Генералов Владимир Михайлович (vmgeneral@mail.ru), Абалтусова Наталья Владиславовна (abaltusova79@mail.ru),
 Кручинина Элина Владимировна (linkruchinina@yandex.ru).

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»