

- К проблеме психогенных дерматозов // Рос. журн. кож. и вен. бол. — 2006. — № 4. — С.29-32.
56. Finlay A.Y. Quality of Laife Survey // Exchange. — 1994. — P.22-73.
57. Finlay A.Y. // Br. J. Dermatol. — 1997. — Vol. 136. — P.305-314.
58. Hays R.D., Bickery B.G., Hermann B.P., et al. // Quality Laif Res. — 1995. — Vol. 4. — P.159-168.
59. Pacan P., Szepietowski J.C., Kiejna A. // Dermatol. Psychosom. — 2003. — Vol. 4. — P.142-145.
60. Spector W.D., Katz S., Murphy J.B., Fulton J.P. The Hierarchical relationship between activities of daily living and instrumental activities of daily living // J Chron Dis. — 1987. — Vol. 40: Suppl. 6. — P.481-489.
61. The WHOQOL Grupp. The world Health Organization Quality of Laif Assessment (WHOQOL): position paper from the World Health Organization // Soc Sci Med. — 1995. — Vol. 41. — P.1403-1409.
62. Wisnicka B., Szepietowski J.C., Reich A., Orda A. // Dermatol. Psychosom. — 2004. — Vol. 5. — P.73-78.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОРОТАЕВА Н.С., ГОРОХОВА В.Г., КУЗНЕЦОВА Э.Э., ЧАШКОВА Е.Ю., ПАКВ.Е., ПОРЯДИНА О.В. — 2008

ЯМР-СПЕКТРОСКОПИЯ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ С БОЛЕЗНЬЮ КРОНА

Н.С. Коротаева, В.Г. Горохова, Э.Э. Кузнецова, Е.Ю. Чашкова, В.Е. Пак, О.В. Порядина

(ГУ Научный центр реконструктивно-восстановительной хирургии Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН, директор — член-корр. РАМН, проф. Е.Г. Григорьев; Иркутский государственный медицинский университет, ректор — д.м.н., проф. И.В. Малов, кафедра госпитальной хирургии ИГМУ, зав. — д.м.н., член-корр. РАМН, проф. Е.Г. Григорьев)

Резюме. Проведенное ЯМР-спектроскопическое исследование эритроцитов у больных с болезнью Крона, позволило рассмотреть состояние белковых и липидных фрагментов клеточной мембраны и оценить изменение ее структурно-функциональных свойств. Изменения вязкости, текучести мембраны и процессов энергообеспечения клетки приводят к нарушению внутриклеточного метаболизма, асимметрии клеточной мембраны и межмембранного взаимодействия. **Ключевые слова:** ЯМР-спектроскопия эритроцитов, клеточные мембраны, болезнь Крона.

Проблемы своевременной диагностики болезни Крона, определение сроков и объема оперативного вмешательства, тактики ведения больного, на сегодняшний день являются одними из спорных и не решенных в современной колопроктологии. Это обусловлено отсутствием четких представлений об этиологии и патогенезе болезни Крона (БК). Представляется актуальным изучение патологических изменений в структурно-функциональных свойствах клеточных мембран у данной категории больных, как одного из этапов в понимании патогенетических механизмов развития болезни.

По результатам исследований, проведенных в лабораториях научного центра реконструктивно-восстановительной хирургии ВСНЦ СО РАМН, у больных с воспалительными заболеваниями толстой кишки (ВЗК), при сложном взаимодействии секвестрированной в просвете толстой кишки крови и продуктов жизнедеятельности нитратобразующих микроорганизмов, происходит возрастание пула высокотоксичных мет-Нб и гем-НО. Образовавшийся комплекс во много раз превосходит действие бактериальных токсинов, обуславливая один из возможных механизмов клеточного повреждения и системного воспалительного ответа. По уровню накопления и химическому составу молекул средней и низкой молекулярной массы, отражающих суммарное содержание продуктов метаболизма, судят об их повреждающем воздействии на клеточные мембраны. В работах многих авторов установлена высокая степень корреляции изменений свойств мембран эритроцитов и клеточных мембран внутренних органов, что

позволяет использовать эритроцитарные мембраны в качестве наиболее доступной модели для установления общих мембранных характеристик [3,4,5].

Перспективным и современным методом исследования, позволяющим детально оценить структурно-метаболические свойства клеточной мембраны и идентифицировать конкретные области повреждения, является ЯМР-спектроскопия [2].

Целью исследования явилось изучение структурно-метаболических характеристик клеточных мембран эритроцитов у больных с болезнью Крона.

Материалы и методы

Обследовано 11 больных, страдающих болезнью Крона (7 женщин и 4 мужчин), в возрасте от 18 до 58 лет. Группа составила 12 человек практической здоровых волонтеров, сопоставимых по полу и возрасту.

Исследовали эритроциты пациентов и волонтеров. Для приготовления взвеси брали кровь из вены, стабилизировали ее 3,8% раствором цитрата натрия из расчета 1:9. Эритроциты отмывали буферным раствором (ph-7,36), содержащим 154 ммоль/л NaCl и 4,3 ммоль/л KCl при t 2-3⁰C трехкратным центрифугированием при 1500-2000 об/мин. в течение 15 мин. [2].

ЯМР-спектры эритроцитов записывались на ЯМР-спектрометре «DRX-500», фирма Bruker (Германия) при условиях: ширина импульса — 10 мс, время задержки импульса — 1-2 с, время накопления спектра 30 мин. Важными ядрами при исследовании биопроб, явились протонные (¹H) и фосфорные (³¹P) ядра. Для ¹H-спектров в работе использована частота 500,13 МГц; ³¹P-спектров — 202,46 МГц. Накопление и обработка спектров производилась программой XMIN-NMR. Version 3.1.

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с помощью программы Statistica for Windows 6.0. Для установления различий использовали непараметрический критерий Манна-Уитни, различия считали

значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При оценке компонентов ^{31}P ЯМР-спектра клеточных мембран обращали внимание на основные фосфорные ядра: неорганический фосфат (НФ), монофосфат (МФ), 2,3-дифосфолипид (2,3-ДФГ), α , β и γ -аденозинтрифосфаты (α -АТФ, β -АТФ, γ -АТФ), характеризующие метаболические и энергетические процессы в клетке (рис. 2) [2].

внутриклеточные катионы; действует как буферный агент; служит резервом при чрезвычайных случаях, когда клетка не имеет запасов креатининфосфата и гликогена; связывается с гемоглобином, уменьшая его сродство к кислороду и облегчая его освобождение в тканях [4].

Выявленные изменения клеточных мембран у больных с болезнью Крона с помощью ^{31}P ЯМР-спектро-

Таблица 1

Показатели ^{31}P ЯМР-спектра эритроцитов

Группы	НФ,%	2,3-ДФГ,%	МФ,%	α -АТФ,%	β -АТФ,%	γ -АТФ,%	Σ АТФ,%	Энергетический заряд, e
больные (n=11)	19,47± 2,95*	50,45± 3,07	2,25± 0,21	14,05± 0,41	4,70± 0,39*	9,09± 0,41	27,74± 1,06	0,592± 0,009*
волонтеры (n=12)	12,90± 0,75*	55,36± 1,01	2,38± 0,18	14,11± 0,20	5,67± 0,18*	9,52± 0,19	29,20± 0,43	0,572± 0,003*

Примечание: * - $p < 0,05$.

У больных с болезнью Крона по ^{31}P ЯМР-спектрокопии выявлено значимое увеличение уровня неорганического фосфата, снижение уровня β -АТФ и увеличение энергетического заряда эритроцита на 0,02 (табл. 1).

скопии, свидетельствуют о нарушении энергозависимых процессов в клетке, и, следовательно, изменении ее внутреннего состава и мембранного потенциала.

При изучении ^1H ЯМР-спектров (рис. 4) важными

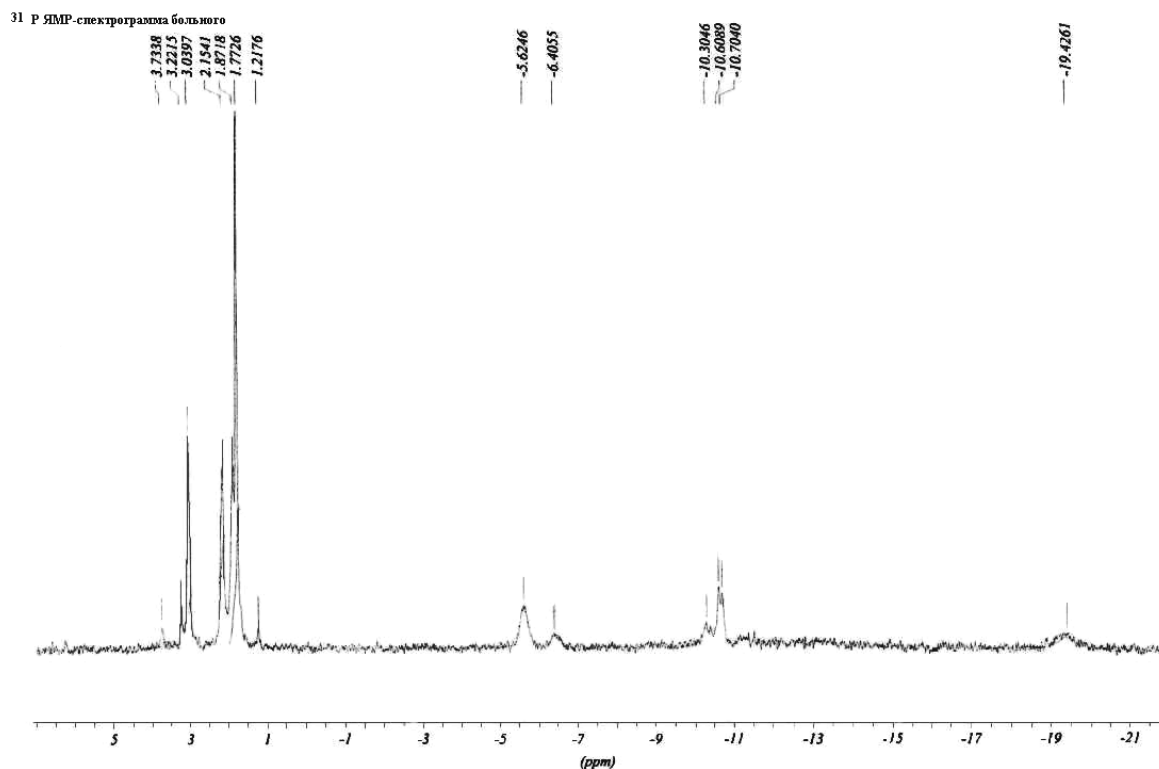


Рис. 1. ^{31}P ЯМР-спектрограмма больного.

На ^{31}P ЯМР-спектрограмме больного с болезнью Крона (рис. 1), отмечается увеличение высоты пика неорганического фосфата и снижение высоты пика 2,3-ДФГ, по сравнению ^{31}P ЯМР-спектрограммой волонтера (рис. 2).

Увеличение содержания неорганического фосфата мы расценили как снижение ферментативной активности 2,3-дифосфолипидов. Известно, что 2,3-дифосфолипид выполняет несколько функций: является главным фосфорсодержащим соединением в эритроцитах и служит важным анионом, уравнивающим

областями спектра являются алифатическая (диапазон 0,2-4,0 мд), ароматическая (диапазон 6,5-8,0 мд) и пик воды от 4,0 до 6,0 мд (в этой области сигналы эфирных групп и полисахаридов) [2].

Алифатическая область, на ^1H ЯМР-спектрах больных с болезнью Крона, по ширине и количеству пиков значимо не отличается от группы волонтеров (табл. 2), но пики этой области в основном представлены неразрешенными гауссовыми кривыми (рис. 3), в отличие от ^1H ЯМР-спектрограмм волонтеров (рис. 4), на которой наличие четко разрешенных чередующихся острых пи-

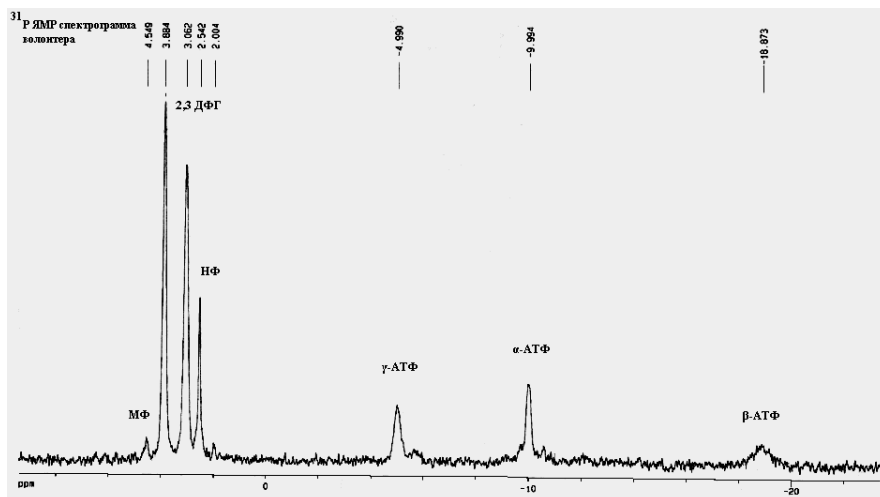


Рис. 2. ³¹P ЯМР-спектрограмма волонтера.

ков в этой области, свидетельствует о подвижности молекулярных группировок биомембран и характеризует их текучесть и вязкость [1,2]. Это свойственно для из-

снизение высоты основного пика (табл. 3). Эти показатели так же указывают на изменение вязкости и подвижности компонентов клеточной мембраны.

Таблица 2

Показатели ¹H ЯМР-спектра, алифатическая область

Группы	Ширина алифатической части, мд	Количество пиков	1 пик		2 пик		3 пик		4 пик		5 пик	
			хим. сдвиг, мд	высота, мм	хим. сдвиг, мд	высота, мм	хим. сдвиг, мд	высота, мм	хим. сдвиг, мд	высота, мм	хим. сдвиг, мд	высота, мм
больные (n=11)	34,90±0,32	4,46±0,47	0,66±0,03	4,98±1,61	1,03±0,02	34,40±11,58	1,40±0,08	3,66±2,15	1,80±0,09*	0,93±0,23	1,35±0,05*	1,25±0,25
волонтеры (n=12)	35,0±0	4,85±0,30	0,72±0,02	6,10±1,45	0,99±0,001	42,70±4,03	1,23±0,04	5,30±1,50	1,41±0,04*	0,60±0,14	2,01±0,02*	1,90±0,30

Примечание: *- p< 0,01.

мененных алифатических структурных фрагментов, основных молекул биомембран: фосфолипидов, гликолипидов и гликопротеинов. Возможно, этим объясняется снижение внутримембранных и межмолекулярных движений, приводящих к асимметрии клеточной мембраны.

Выявленные изменения в алифатической и ароматической областях ¹H ЯМР-спектра у больных с болезнью Крона можно расценить как дезорганизацию белкового и липидного состава клеточной мембраны [1].

Таким образом, фосфорная и протонная ЯМР-спектроскопия выявила значимые различия в структурно-

метаболических свойствах клеточных мембран у больных с болезнью Крона, которые объясняют изменения вязкости, текучести, подвижности мембраны и нарушения процессов энергообеспечения клетки. Это существенно не только для состояния внутримембранных структур, но и для взаимодействия мембран друг с другом. Возможно, исследования в данной области помогут подойти к раскрытию механизмов патогенеза воспалительных заболеваний толстой кишки, что требует дальнейшего изучения и осмысления.

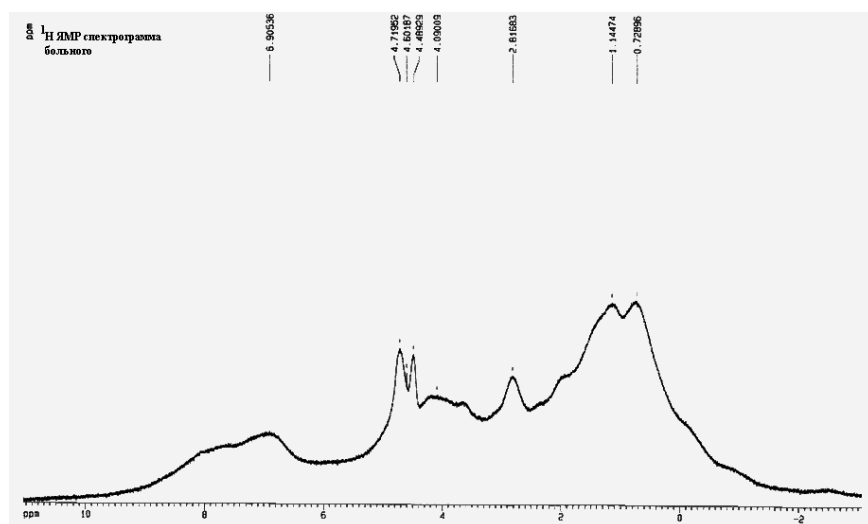


Рис. 3. ¹H ЯМР- спектрограмма взвеси эритроцитов больного.

Показатели области фосфотидилхолина и ароматической части 1H-ЯМР спектра

Группы	Хим. сдвиг пика фосфотидилхолина, мд	Высота пика фосфотидилхолина, мм	Ширина ароматической части, мд	Количество пиков в ароматической части	Химич. сдвиг основного пика, мд	Высота основного пика, мм
больные (n=11)	3,19±0,01	0,18±0,08*	44,44±2,36*	3,0±0,50**	6,82±0,80	3,689±0,80**
волонтеры (n=12)	3,19±0,02	1,16±0,37*	54,10±1,90*	4,71±0,60**	7,13±0,03	7,33±0,80**

Примечание: * - $p < 0,01$, ** - $p < 0,05$.

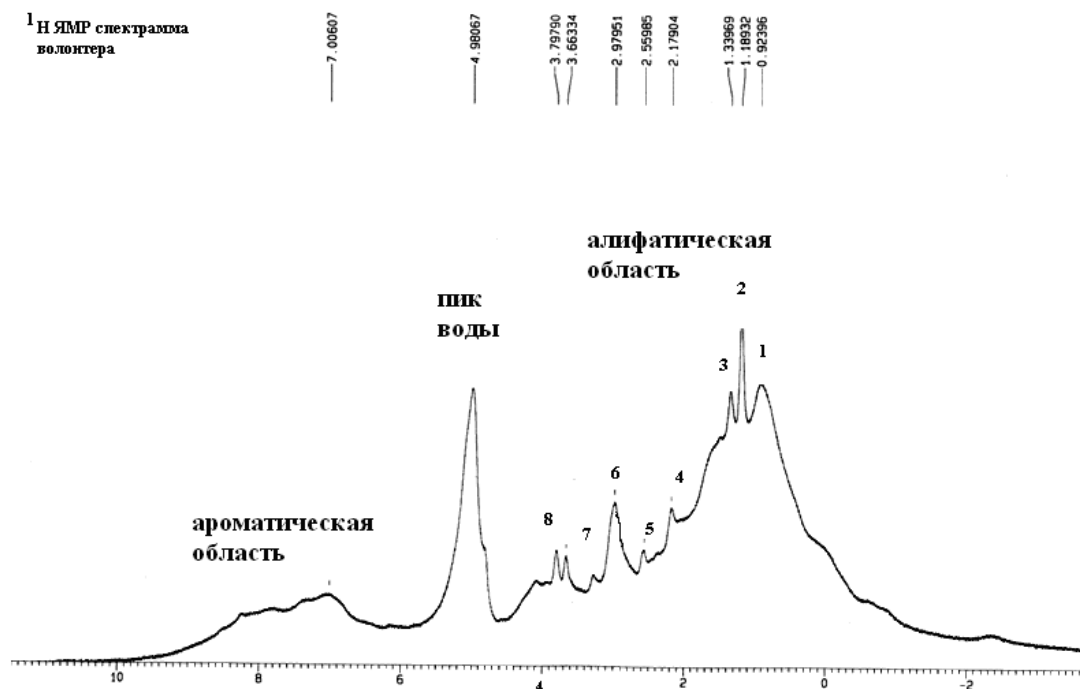


Рис. 4. ¹H ЯМР-спектрограмма взвеси эритроцитов волонтера.

MR-SPECTROSCOPY OF ERYTHROCYTE MEMBRANES IN PATIENTS WITH CROHN'S DISEASE

N.S. Korotaeva, V.G. Gorokhova, E.E. Kuznetsova, E.Yu. Chashkova, V.E. Pack, O.V. Poryadina
(Scientific Centre of Reconstructive and Restorative Surgery Russian Academy of Medical Sciences, Irkutsk State Medical University)

MR-spectroscopy study of erythrocytes in patients with Crohn's disease made it possible to examine the state of protein and lipid fragments of cell membrane and assess the changes in its structural and functional features. Changes in membrane viscosity and fluidity and in the processes of cell energy provision resulted in the disorders of intracellular metabolism, cell membrane asymmetry and intermembranous interaction.

ЛИТЕРАТУРА

1. Болдырев А.А. Введение в биохимию мембран. — М.: Высшая школа, 1986. — 108 с.
2. Кручинина М.В., Курилович С.А., Паруликова М.В., Шакиров М.М. ЯМР-спектроскопия эритроцитов у больных с патологией печени // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. — 2003. — Приложение «Гепатология». — № 2. — С.28-33.
3. Мак-Мюррей У. Обмен веществ у человека. — М.: Мир, 1980. — 368 с.
4. Марусанов В.Е., Михайлович В.А., Домацкая И.А., Гуло С.Л. Характеристика стадий эндогенной интоксикации // Эфферентная терапия. — 1995. — Т. 1, № 2. — С.26-30.
5. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степанова Е.А. и др. Молекулярные нарушения мембраны эритроцитов при патологии разного генеза являются типовой реакцией организма; контуры проблемы // Бюллетень Сибирской медицины. — 2006. — № 2. — С.62-70.