

## СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ НАРУШЕНИЯ КЛЕТОЧНОЙ МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТА ПРИ БОЛЕЗНИ КРОНА

Чашкова Е. Ю., Горохова В. Г., Кузнецова Э. Э., Коротаева Н. С., Григорьев Е. Г., Пак В. Е.,  
Бараков Р. Ф.

ГУ Научный центр реконструктивно-восстановительной хирургии Восточно-Сибирского научного  
центра Сибирского отделения РАМН

Чашкова Е. Ю.  
664076 г. Иркутск, микрорайон Юбилейный 100, а/я 23  
Иркутский государственный медицинский университет  
Тел.: 8 (3952) 465331  
E-mail: isisecr@inbox.ru

### РЕЗЮМЕ

Исследование мембраны эритроцитов у пациентов, страдающих болезнью Крона, выявило изменения асимметрии ее молекулярных компонентов, нарушение нормального функционирования мембрансвязанных ферментов и энергозависимых процессов в клетке. Механизм повреждающего воздействия на клеточную мембрану обусловлен избыточным накоплением в крови сложного комплекса веществ низкомолекулярной массы, соединениями хинонной и углеводной природы, пептидами, измененными формами адениловых нуклеотидов. Выявленные изменения позволяют судить о выраженности эндогенной интоксикации, повреждении клеточных мембран, которые имеют место не только в период острой атаки заболевания, но и сохраняются в период неполной клинической и эндоскопической ремиссии.

**Ключевые слова:** мембрана эритроцита; ЯМР-спектроскопия; метаболический пул; болезнь Крона.

### SUMMARY

Investigation of erythrocyte membrane in patients with Crohn's disease detected the changes in asymmetry of its molecular components, abnormalities in normal functioning of membrane-associated enzymes and energy-dependent processes in the cell. The mechanism of damaging effect on the cell membrane was caused by the excessive blood accumulation of a composite complex of low-molecular substances, compounds of quinone and carbohydrate nature, peptides, modified forms of nucleotides. The revealed changes make it possible to assess the severity of endogenous intoxication and cell membrane disorder, which take place not only in the course of the disease acute attack, but also retain during the period of incomplete clinical and endoscopic remission.

**Keywords:** erythrocyte membrane; MR-spectroscopy; metabolic pool; Crohn's disease.

### ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на интенсивные поиски исследователей, этиологический агент болезни Крона до сих пор не найден и патогенез не ясен. Неизвестно, являются ли иммунные нарушения первичными или они возникают в ответ на хроническое воспаление (то есть вторичны) [13]. Это обуславливает трудности в лечении и требует дальнейших разработок как в изучении этиопатогенеза и механизмов патофизиологии, так и в поисках средств для облегчения этого тяжелого страдания.

Известно, что развитие любого заболевания сопряжено с нарушением структурно-функциональных характеристик тех или иных клеток организма. 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, так как ей присущи основные принципы молекулярной организации плазматических мембран [2; 8–10].



Таблица 1

| ПОКАЗАТЕЛИ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ И СТЕПЕНИ ЭНДОГЕННОЙ ИНТОКСИКАЦИИ |                                  |  |                                     |  |   |                                  |
|---|----------------------------------|--|-------------------------------------|--|---|----------------------------------|
|   | Мембрансвязанный гемоглобин (%)  | Сорбционная способность эритроцита (%) | Индекс эндогенной интоксикации (%)  | Суммарный метаболический пул эритроцитов (у. е.) | Окисленные адениловые нуклеотиды (у. е.)          | Общий метаболический пул (у. е.) |
| Пациенты в период острой атаки (n = 19)   | 8,5 (7,0–9,0),<br>P <sub>u</sub> | 56,4 (50,0–64,0),<br>P <sub>u</sub>    | 29,1 (27,5–30,9),<br>P <sub>u</sub> | 3,6 (2,7–4,9),<br>P <sub>u</sub>                 | 0,3 (0,2–0,4),<br>P <sub>u</sub> , P <sub>w</sub> | 5,9 (4,6–7,5),<br>P <sub>u</sub> |
| Пациенты в период неполной ремиссии (n = 13)  | 6 (3,2–11,0),<br>P <sub>u</sub>  | 48,0 (37,0–59,5),<br>P <sub>u</sub>    | 30,7 (28,4–36,7),<br>P <sub>u</sub> | 3,3 (2,7–4,6),<br>P <sub>u</sub>                 | 0,2 (0,1–0,2),<br>P <sub>u</sub> , P <sub>w</sub> | 5,4 (4,5–6,5),<br>P <sub>u</sub> |
| Волонтеры (n = 12)  | 5,0 (4,0–6,0)                    | 37 (31,0–43,4)                         | 13,5 (10–15,2)                      | 1,0 (0,5–1,9)                                    | 0,05 (0,02–0,1)                                   | 4,4 (3,5–4,6)                    |

Примечание:

Данные представлены в виде медианы, в скобках — 25-й и 75-й процентиля.

P<sub>u</sub> — p < 0,05 при сравнении групп пациентов с группой волонтеров по критерию Манна — Уитни.

P<sub>w</sub> — p < 0,05 при сравнении групп пациентов между собой по критерию Вилкоксона.

**Цель:** изучить структурно-метаболические характеристики клеточных мембран эритроцитов у пациентов с болезнью Крона в период острой атаки и период неполной клинической и эндоскопической ремиссии.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обследованы 19 пациентов (11 женщин и 8 мужчин) в возрасте от 18 до 58 лет, страдающие болезнью Крона в период острой атаки (индекс активности Беста  $\geq 350$  баллов) и в период неполной клинической и эндоскопической ремиссии (индекс активности Беста  $\leq 250$  баллов) на фоне проведения стандартного консервативного лечения. Консервативная терапия включала глюкокортикостероидные препараты, препараты 5-аминосалициловой кислоты, антибактериальную терапию. Группа сравнения составила 12 практически здоровых волонтеров, сопоставимых по полу и возрасту.

Для оценки тяжести эндогенной интоксикации определяли общий метаболический пул сыворотки крови и суспензии эритроцитов; после осаждения высокомолекулярных соединений снимали обзорную УФ-спектрограмму в интервале длин волн 210–300 нм по методике М. Я. Малаховой [6].

Состав метаболического пула сыворотки крови и эритроцитов исследовали посредством комплекса физико-химических методов: УФ-спектроскопия (спектрофотометр СФ-46м); высокоэффективная тонкослойная и реакционная бумажная хроматография; мембранная ультрафильтрация.

Структурно-метаболические свойства мембраны эритроцитов больных и волонтеров оценивали

с помощью сорбционной способности эритроцитов [11], мембрансвязанному гемоглобину [12] и более перспективного метода, позволяющего идентифицировать конкретные области повреждения мембраны, — ЯМР-спектроскопии эритроцитов на фосфорных (<sup>31</sup>P) и протонных (<sup>1</sup>H) ядрах [4].

При рассмотрении компонентов <sup>31</sup>P ЯМР-спектра клеточных мембран обращали внимание на основные фосфорные ядра: неорганический фосфат (НФ), монофосфат (МФ), 2,3-дифосфоглицерат (2,3-ДФГ),  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -аденозинтрифосфаты ( $\alpha$ -АТФ,  $\beta$ -АТФ,  $\gamma$ -АТФ), характеризующие метаболические и энергетические процессы в клетке (рис. 3). На <sup>1</sup>H ЯМР-спектрах (рис. 5) важными областями 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) [4].

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с помощью программы *Statistica for Windows 6.0*. Сравнение групп осуществляли при помощи непараметрических критериев Манна — Уитни (P<sub>u</sub>) и Вилкоксона (P<sub>w</sub>). Полученные данные математически обработаны и представлены в виде медианы с нижним и верхним квартилями (25-й и 75-й процентиля). Значимыми считали различия при p < 0,05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Уровень общего метаболического пула сыворотки крови у пациентов с болезнью Крона в период острой атаки значительно превышал таковой в группе

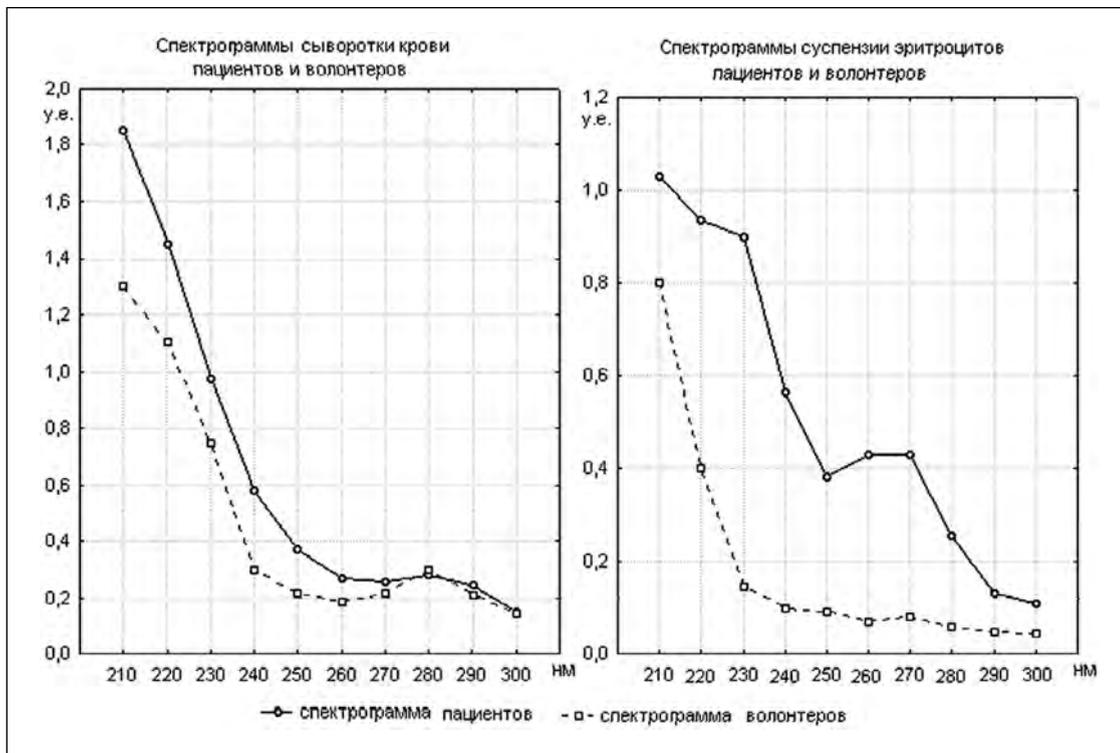


Рис. 1. УФ-спектрограммы сыворотки крови и суспензии эритроцитов пациентов с болезнью Крона и волонтеров

сравнения и составил соответственно 5,9 и 4,4 у. е. (табл. 1). Индекс интоксикации в исследуемой группе также оказался достоверно выше (29,1% против 13,5%) (табл. 1). Данные изменения обусловлены накоплением комплекса токсических веществ молекулярной массы менее 1000 Д, представленных в основном соединениями пептидной структуры, содержащими ароматический фрагмент и фракциями неустойчивых компонентов фенольного характера. Однако в 60% случаев удалось получить информацию о хинонной природе этих веществ, которые, активно запуская процессы перекисного окисления липидов, обладают высокой повреждающей способностью. Области характеризующие накопление этих веществ отражены на УФ-спектрограмме сыворотки крови пациентов в диапазоне волн 210–230 и 240–260 нм (рис. 1).

УФ-спектроскопия суспензии эритроцитов пациентов в период острой атаки показала увеличение суммарного метаболического пула в 2,3 раза (табл. 1). Наиболее существенными эти изменения оказались в диапазоне длин волн 210–290 нм (рис. 1). Выявленные различия обусловлены накоплением низкомолекулярной фракции пептидных соединений (диапазон волн 210–240 нм), часть которых удалось идентифицировать (серотонин, гистамин, брадикинин, белки острой фазы), углеводов компонентов, а также комплекса неустойчивых соединений хинонной структуры.

Появление в кислой фракции солей фосфатидов (в 80–85%) за счет измененных форм адениловых

нуклеотидов (табл. 1) (регистрируются в диапазоне волн 250–290 нм — рис. 2) свидетельствует о нарушении процессов окислительного фосфорилирования и регуляции процессов аккумуляции и утилизации энергии в эритроцитах [5].

Полученные данные характеризуют развитие выраженной эндогенной интоксикации у пациентов, страдающих болезнью Крона, — фазы накопления токсических продуктов, которая проявляется обратимой несостоятельностью функции печени и почек [7].

Изменения структурно-функциональных свойств мембран эритроцитов у исследуемых пациентов в период острой атаки нашли подтверждение в значимом увеличении сорбционной способности эритроцитов и мембрансвязанного гемоглобина (табл. 1). Это свидетельствует о нарушении целостности клеточных мембран, повреждении их белковой и фосфолипидной компоненты [11; 12].

При оценке динамики уровня окисленных адениловых нуклеотидов отмечено значимое снижение их в период стихания активности болезни. При этом по другим показателям достоверных различий не получено (табл. 1). Таким образом, у пациентов при положительной клинико-лабораторной и эндоскопической динамике сохраняются признаки повреждения клеточных мембран. Однако снижение уровня окисленных адениловых нуклеотидов в суспензии эритроцитов свидетельствует о появлении тенденции к нормализации процессов окислительного фосфорилирования и энергообеспечения клетки.

Таблица 2

| ПОКАЗАТЕЛИ <sup>31</sup> P ЯМР-СПЕКТРА ЭРИТРОЦИТОВ |                      |                     |                  |                     |                    |                   |                     |                          |
|--|----------------------|---------------------|------------------|---------------------|--------------------|-------------------|---------------------|--------------------------|
| Группы   | НФ (%)               | 2,3-ДФГ (%)         | МФ (%)           | α-АТФ (%)           | β-АТФ (%)          | γ-АТФ (%)         | Σ АТФ (%)           | Энергетический заряд (e) |
| Пациенты (n = 11)                                  | 18,8<br>(16,8–23,8)* | 52,2<br>(45,9–58,1) | 2,1<br>(1,8–2,5) | 14,0<br>(13,1–14,8) | 4,96<br>(4,5–5,5)* | 9,2<br>(8,0–10,1) | 28,3<br>(26,3–30,5) | 0,59<br>(0,58–0,60)*     |
| Волонтеры (n = 12)                                 | 12,6<br>(12,4–12,7)* | 54,9<br>(54,6–55,9) | 2,5<br>(2,2–2,9) | 14,1<br>(13,9–14,4) | 5,9<br>(5,2–6,0)*  | 9,4<br>(9,39–9,7) | 29,8<br>(28,5–30,5) | 0,57<br>(0,57–0,58)*     |

Примечание:

Данные представлены в виде медианы, в скобках — 25-й и 75-й процентиля.

\*—  $p_u < 0,05$  при сравнении по критерию Манна — Уитни.

Таблица 3

| ПОКАЗАТЕЛИ АЛИФАТИЧЕСКОЙ И АРОМАТИЧЕСКОЙ ОБЛАСТИ <sup>1</sup> H-ЯМР СПЕКТРА |                                |  |                                       |                                   |                                |  |
|---|--------------------------------|--|---------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|--|
| Группы  | Ширина алифатической части, мд | Количество пиков в алифатической части | Хим. сдвиг пика фосфотидилохолина, мд | Высота пика фосфотидилохолина, мм | Ширина ароматической части, мд | Количество пиков в ароматической части |
| Пациенты (n = 11)   | 34,9<br>(30,4–35,0)            | 4,0 (4,0–4,0)                          | 3,2 (3,2–3,2)                         | 0,1 (0,1–0,1)*                    | 46,0<br>(44,0–50,0)*           | 3,0 (2,0–4,0)*                         |
| волонтеры (n = 12)  | 35,0<br>(35,0–35,0)            | 5,0 (4,5–5,0)                          | 3,2 (3,2–3,2)                         | 1,1 (0,7–1,7)*                    | 55,5<br>(54,0–57,0)*           | 4,0 (4,0–5,0)*                         |

Примечание:

Данные представлены в виде медианы, в скобках — 25-й и 75-й процентиля.

\*—  $p_u < 0,05$  при сравнении по критерию Манна — Уитни.

Полученные результаты потребовали более детального исследования структурно-метаболических характеристик мембран клеток на молекулярном уровне, с применением ЯМР-спектроскопии на фосфорных и водородных ядрах.

У исследуемых пациентов по <sup>31</sup>P ЯМР-спектроскопии выявлено значимое увеличение уровня неорганического фосфата, снижение уровня β-АТФ и увеличение энергетического заряда эритроцита на 0,02 (табл. 2) по сравнению с группой практически здоровых волонтеров. Снижение уровня АТФ обуславливает жесткость клеточной мембраны [14], при этом нарушается деформируемость эритроцита, то есть снижается его способность изменять свою конфигурацию.

Увеличение высоты пика НФ и снижение высоты пика 2,3-ДФГ (рис. 2), регистрируемые на фосфорной спектрограмме, расценены нами как снижение ферментативной активности 2,3-ДФГ. Известно, что 2,3-ДФГ выполняет несколько функций: является главным фосфорсодержащим соединением в эритроцитах и служит важным анионом, уравновешивающим 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 [5; 8].

Также отмечено, что снижение активности 2,3-ДФГ сопровождается нарушением деформируемости эритроцитарной мембраны [15].

Выявленные с помощью <sup>31</sup>P ЯМР-спектроскопии изменения клеточных мембран у пациентов с болезнью Крона свидетельствуют о нарушении энергозависимых процессов в клетке и, следовательно, изменении ее внутреннего состава, мембранного потенциала и нарушении функциональной способности эритроцита.

На <sup>1</sup>H ЯМР-спектрах пациентов исследуемой группы алифатическая область по ширине и количеству пиков значимо не отличается от группы волонтеров (табл. 3), но пики этой области в основном представлены неразрешенными гауссовыми кривыми (рис. 4) в отличие от спектрограмм здоровых лиц (рис. 5), на которых наличие четко разрешенных чередующихся острых пиков свидетельствует о подвижности молекулярных группировок мембраны и характеризует ее текучесть и вязкость [1; 4].

Нормальное функционирование эритроцитарной мембраны зависит от ее микровязкостных свойств, определяемых главным образом состоянием ее липидной фазы [10]. Липидные молекулы, являясь важными структурными и функциональными компонентами мембраны эритроцита, регулируют подвижность и активность внутримембранных белков и тем самым обеспечивают

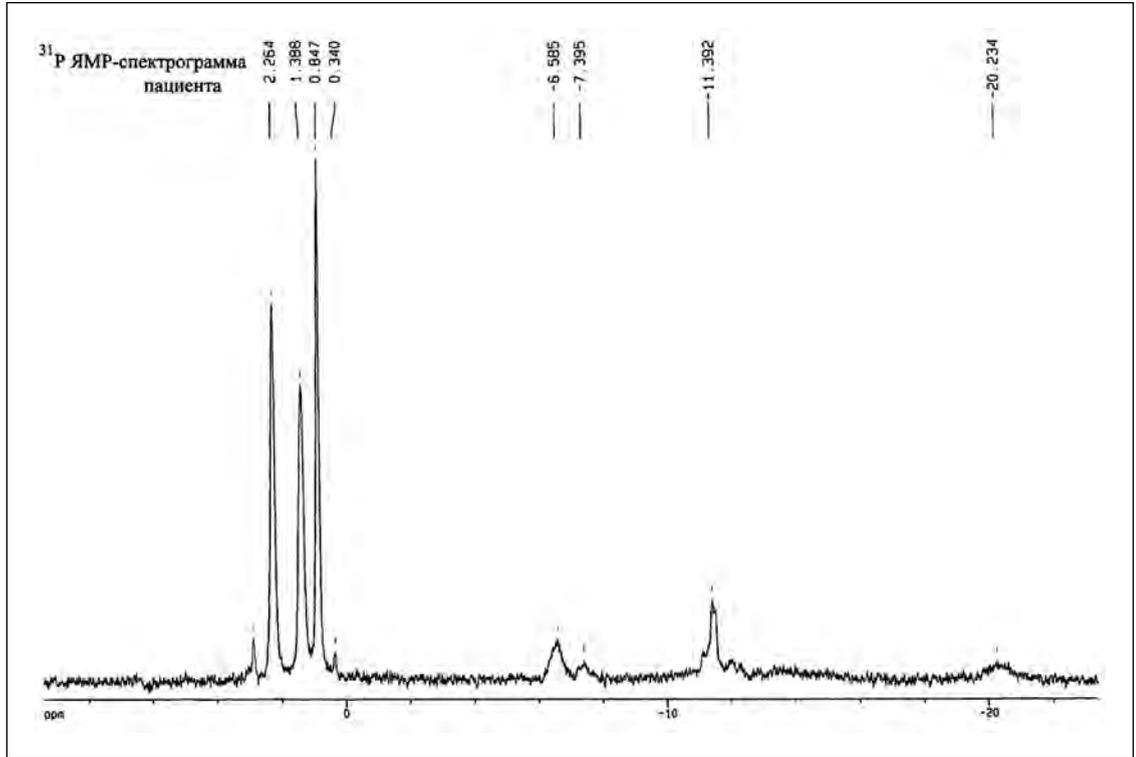


Рис. 2. <sup>31</sup>P ЯМР-спектрограмма взвеси эритроцитов пациента

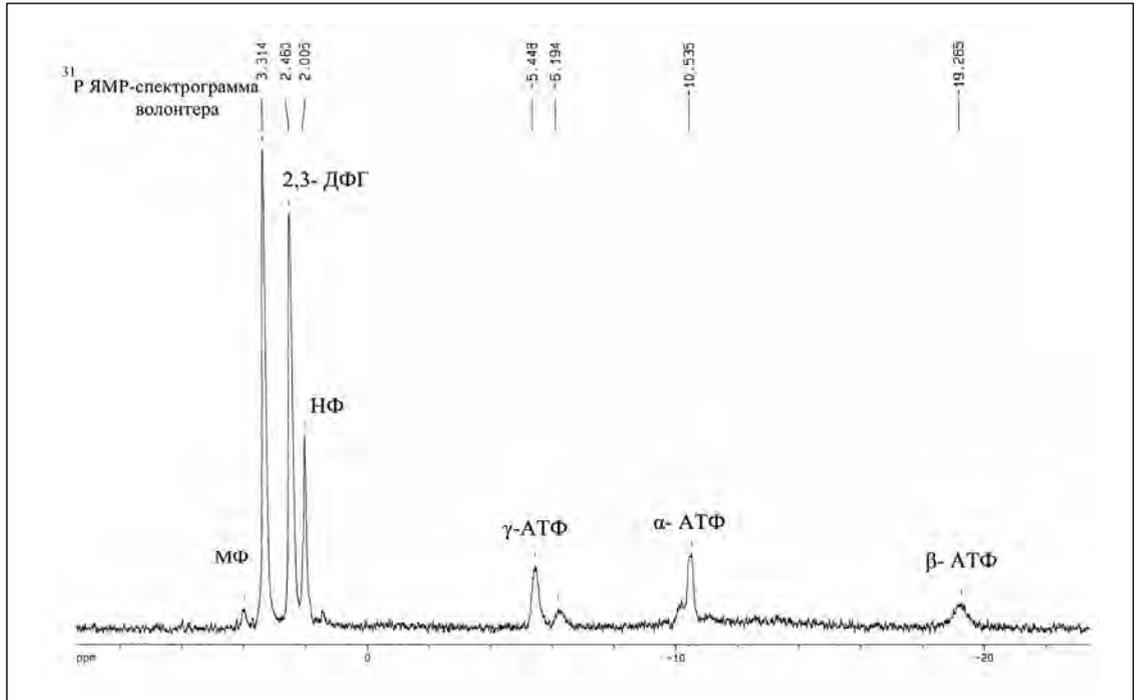


Рис. 3. <sup>31</sup>P ЯМР-спектрограмма взвеси эритроцитов волонтера



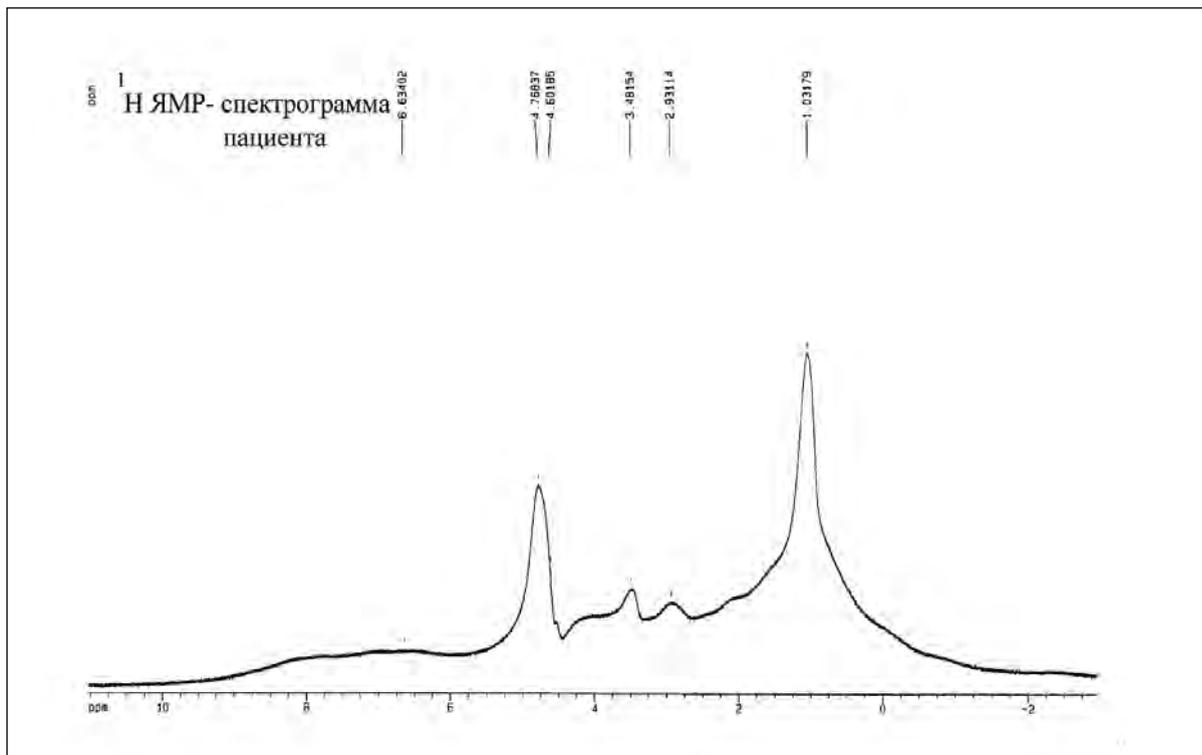


Рис. 4. <sup>1</sup>H ЯМР-спектрограмма взвеси эритроцитов пациента

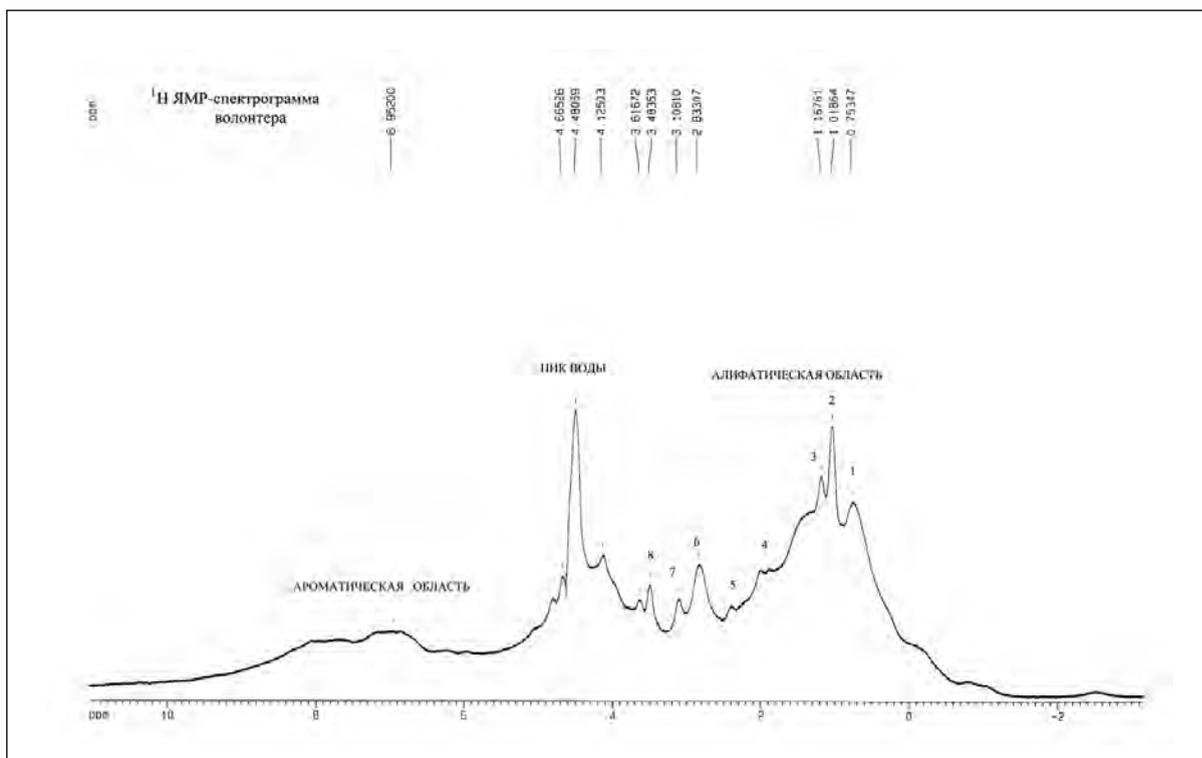


Рис. 5. <sup>1</sup>H ЯМР-спектрограмма взвеси эритроцитов волонтера



клетке селективную проницаемость, нормальное функционирование мембранассоциированных ферментов, а также рецепторного аппарата клетки [9]. Выявленные изменения в алифатической области (фосфолипиды, гликолипиды) указывают на дисбаланс внутримембранных и межмолекулярных движений, приводящих к нарушению асимметрии клеточной мембраны и модификации липидной составляющей.

Значимое снижение высоты пика фосфотидилхолина (3,23 мд, пик 8 — алифатическая область) у пациентов с болезнью Крона (табл. 3, рис. 4) свидетельствует о нарушении соотношения фосфотидилхолин/фосфотидилэтанолламин в цитоплазматической мембране эритроцита [1; 2]. Фосфолипиды, являясь необходимым структурным компонентом эритроцитарной мембраны, регулируют активный и пассивный транспорт веществ, определяют чувствительность клеток к действию лигандов, детерминируют активность мембрансвязанных систем [1–3].

При рассмотрении ароматической области  $^1\text{H}$  ЯМР-спектра (рис. 4), характеризующей состояние белковой компоненты мембраны, у пациентов отмечено значимое уменьшение ширины области, количества пиков и снижение высоты основного пика (табл. 3).

Выявленные изменения в алифатической и ароматической областях  $^1\text{H}$  ЯМР-спектра у исследуемой группы можно расценивать как дезорганизацию белково-липидного состава клеточной мембраны, нарушение мембрансвязанных процессов энергообеспечения клетки, о чем свидетельствуют и данные  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектроскопии. Нарушение архитектоники эритроцитарной мембраны, изменение ее формы, размеров и способности к изменению конфигурации проявляется у этих пациентов анизоцитозом

$16,7 \pm 0,9\%$  (в норме 11,5–14,5%), сопровождающимся умеренно выраженной анемией. Возможно, такие эритроциты устраняются из кровотока и разрушаются в селезенке. Не исключено, что это один из механизмов хронической анемии у пациентов в различные периоды болезни.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нарушения структурно-метаболических характеристик клеточных мембран у пациентов, страдающих болезнью Крона в период острой атаки, проявляются изменением молекулярной организации цитоплазматической мембраны, внутриклеточного гомеостаза и функциональной активности клеток организма. Повреждающее воздействие на клеточную мембрану обусловлено избыточным накоплением в крови сложного комплекса токсических веществ углеводной природы, низкомолекулярных пептидов, обладающих высокой окислительной способностью. Количественное накопление этих токсических агентов усугубляет течение патологического процесса, оказывая воздействие на органы и системы организма, способствуя генерализации программной составляющей воспаления.

Повреждения цитоплазматических мембран, характеризующие выраженность эндогенной интоксикации, имеют место не только в период острой атаки заболевания, но и сохраняются в период неполной клинической и эндоскопической ремиссии. Это обуславливает трудности в лечении данной категории пациентов и требует дальнейших разработок в изучении механизмов патологических процессов, возникающих при болезни Крона.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Болдырев А. А. Введение в биохимию мембран. — М.: Высшая школа, 1986. — 108 с.
2. Василенко И. А., Боровягин В. Л. Полиморфизм липидов модельных и биологических мембран//Биологические мембраны. — 1990. — № 7. — С. 677–702.
3. Кручинина М. В., Курилович С. А., Паруликова М. В. и др. ЯМР-спектроскопия эритроцитов у больных с патологией печени//Эксперим. и клин. гастроэнтерол., прил. «Гепатология». — 2003. — № 2. — С. 28–33.
4. Мак-Мюррей У. Обмен веществ у человека. — М.: Мир, 1980. — 368 с.
5. Малахова М. Я. Метод регистрации эндогенной интоксикации: пособие для врачей. — СПб.: МАПО, 1995. — 33 с.
6. Малахова М. Я. Эндогенная интоксикация как отражение компенсаторной перестройки обменных процессов в организме//Эфферентная терапия. — 2000. — Т. 6, № 4. — С. 3–14.
7. Марусанов В. Е., Михайлович В. А., Доманская И. А. и др. Характеристика стадий эндогенной интоксикации//Эфферентная терапия. — 1995. — Т. 1, № 2. — С. 26–30.
8. Новицкий В. В., Рязанцева Н. В., Степанова Е. А. и др. Молекулярные нарушения мембраны эритроцитов при патологии разного

9. Рязанцева Н. В., Новицкий В. В. Типовые нарушения молекулярной организации мембраны эритроцита при соматической и психической патологии//Успехи физиол. наук. — 2004. — № 1. — С. 53–65.
10. Тогайбаева А. А., Кургузкина А. В., Рикун И. В. и др. Способ диагностики эндогенной интоксикации//Лабораторное дело. — 1988. — № 9. — С. 22–27.
11. Токтамысова З. С., Биржанова Н. Х. О мембрансвязанном гемоглобине//Биофизика. — 1990. — Т. 35, Вып. 6. — С. 1019–1020.
12. Фаллер Джеральд М., Шилдс, Денис Молекулярная биология клетки/пер. с англ. — М.: Бином-Пресс, 2006. — 256 с.
13. Халиф И. Л., Лоранская И. Д. Воспалительные заболевания кишечника (неспецифический колит и болезнь Крона). Клиника, диагностика и лечение. — М.: Микош, 2004. — 88 с.
14. Hochmuth R. M., Waight R. E.//Ann. Rev. Physiol. — 1987. — Vol. 49. — P. 209–219.
15. Vettore L., Molino A. M., Benini F.//Ric. Clin. Lab. — 1985. — Vol. 5. — P. 51–63.