

Е.Ю. Чашкова, В.Г. Горохова, Э.Э. Кузнецова, Н.С. Коротаева, С.В. Федоров

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОСУБСТРАТОВ У БОЛЬНЫХ
С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ТОЛСТОЙ КИШКИ
(ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЕ СООБЩЕНИЕ)**

*ИЦ РВХ ВСНЦ СО РАМН (Иркутск)
Институт органической химии им. А.Е. Фаворского СО РАН (Иркутск)*

Проведено исследование метаболического пула сыворотки крови и эритроцитов у больных воспалительными заболеваниями толстой кишки в период острой атаки. Выявлен высокий уровень эндогенной интоксикации, обусловленный низкомолекулярными соединениями и веществами хинонной природы. Недостаток энергетических ресурсов в клетке приводит к нарушению ее внутреннего гомеостаза и повреждению целостности мембраны, что обуславливает своеобразие метаболических процессов биотрансформации. Выраженное нарушение детоксикационной функции печени у данной группы больных связано, таким образом, с повреждением мембран эритроцитов и гепатоцитов.

Ключевые слова: клеточные мембраны, метаболический пул, воспалительные заболевания толстой кишки

**PHYSICOCHEMICAL STUDY OF BIOSUBSTRATES IN PATIENTS WITH
INFLAMMATORY DISEASES OF LARGE INTESTINE (DRAFT REPORT)**

Ye.Yu. Chashkova, V.G. Gorokhova, E.E. Kuznetsova, N.S. Korotayeva, S.V. Fiodorov

*SC RRS ESSC SB RAMS, Irkutsk
A.E. Favorskiy's Institute of Organic Chemistry, Irkutsk*

The study of blood serum metabolic pool and erythrocytes was performed in patients with inflammatory bowel diseases during the acute attack. High level of endogenous intoxication caused by low-molecular compounds and quinone substances was found. Deficiency of energy resources in a cell results in the disorder of cell inner homeostasis and damage of membrane integrity which defines the peculiarities of metabolic processes of biotransformation. Evident disorder of the liver detoxication function in the given group of patients is such associated with the damage of erythrocytes and hepatocytes membranes.

Key words: cell membranes, metabolic pool, inflammatory bowel diseases

Еще в 1973 г. В.К. Карнаузов отметил, что «неспецифический язвенный колит (или язвенная болезнь толстой кишки) представляет собой одну из наименее изученных и наиболее интересных проблем современной медицины. Эта проблема волнует многих специалистов из-за значительной распространенности этой болезни во всем мире, тенденции к увеличению числа случаев заболевания как среди взрослых, так и среди детей, тяжести и многообразия клинических проявлений, разнообразия осложнений, требующих хирургического вмешательства и высокой летальности». До сих пор это высказывание остается актуальным и значимым для всей группы воспалительных заболеваний толстой кишки (ВЗК), в которую включены язвенный колит, болезнь Крона и недифференцируемый неспецифический колит. Несмотря на значительный прогресс, достигнутый иммунологами, генетиками, бактериологами в понимании ВЗК, этиологический агент до сих пор не найден и патогенез не ясен. Все это обуславливает трудности в лечении данной категории больных и требует дальнейших разработок как в изучении этиопатогенеза, так и в поисках средств для облегчения этого тяжелого страдания. ВЗК характеризуются широким спектром поражений систем и органов человека, обусловленных многими патогенетически-

ми факторами. В частности, при сложном взаимодействии секвестрированной в просвете толстой кишки крови и продуктов жизнедеятельности нитратобразующих микроорганизмов, происходит возрастание пула высокотоксичных мет-Нв и гем-NO. Образовавшийся комплекс во много раз превосходит действие бактериальных токсинов, обуславливая один из возможных механизмов токсемии при ВЗК. Все вышеизложенное и предопределило необходимость выявления и изучения маркеров эндогенной интоксикации у больных ВЗК и их воздействие на клеточные мембраны. В настоящее время доказано, что эритроцит можно рассматривать как универсальную модель для изучения изменений цитоплазматических мембран и метаболизма клеток. Результаты многих исследований свидетельствуют об исключительной информативности ядерно-магнитной (ЯМР) спектроскопии в изучении состава, строения, структуры и свойств биологических систем, в частности, для изучения динамической структуры клеточных мембран. Фундаментальных исследований в этом направлении у больных ВЗК не проводилось.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проанализированы результаты обследования и лечения 24 пациентов, страдающих ВЗК в пери-

од острой атаки. Возраст пациентов составил от 21 до 70 лет. Женщин и мужчин — по 12 человек. Группа сравнения ($n = 10$) — здоровые добровольцы (доноры), сопоставимые по полу и возрасту с группой пациентов. Изучали состав метаболического пула сыворотки крови и суспензии эритроцитов посредством комплекса физико-химических методов: УФ-спектроскопия (спектрофотометр СФ-46М); высокоэффективная тонкослойная и реакционная бумажная хроматография; спектры фосфорной ЯМР записывались на ЯМР-спектрометре DRX 400, фирмы Bruker (Германия); мембранная ультрафильтрация.

После осаждения высокомолекулярных соединений снимали обзорную спектрограмму в интервале длин волн 210 — 300 нм. Эти области спектров характерны для соединений с пептидными связями, адениловых нуклеотидов и соединений с ароматическими циклами. Катаболический пул, определяющий тяжесть эндогенной интоксикации, определяли в диапазоне волн 230 — 260 нм (по М.Я. Малаховой).

Для оценки биотрансформационной функции печени использовали антипириновый тест (патент № 2228527 от 10.05.2004).

Лейкоцитарный индекс интоксикации (ЛИИ) рассчитывали по Я.Я. Кальф-Калифу. Статистическая обработка результатов исследования проведена с помощью ППП Statistica for Windows 6,0. Показатели среднего значения величины анализированных данных представлены с 95% доверительным интервалом. Значимость различий количественных показателей определяли по Т-критерию Вилкоксона. Критический уровень значимости (p) при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимался равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Общий метаболический пул сыворотки крови исследуемых больных ВЗК (болезнь Крона и язвенный колит) в период острой атаки составил 7,39 (0,8 у.е.), что на 17 % превышает уровень у здоровых доноров. При этом катаболический пул превысил 31 % от суммарного метаболического пула, хотя в норме он составляет не более 10 — 15 %. Лейкоцитарный индекс интоксикации у пациентов в среднем составил $3,7 \pm 1,17$ (у здоровых = $1,5 \pm 0,21$). Возникла необходимость идентификации состава катаболического пула. Мембранная ультрафильтрация показала, что супернатанты сыворотки крови представляют фракции с набором веществ молекулярной массы < 1000 Д. На рис. 1 представлены типичные спектрограммы сыворотки крови больных язвенным колитом и здоровых доноров.

Наиболее выраженные изменения принадлежат фракции соединений при длине волн 210 — 220 нм и 240 — 270 нм. Основными метаболическими спектрами продуктов, определяющих токсический пул у наблюдаемых больных, оказались вещества с пептидными связями, содержащие ароматический фрагмент. В зависимости от тяжести заболевания в пуле токсинов определялись соединения фенольного характера, верификация которых представляла определенную трудность вследствие их неустойчивости. Однако в 60 % случаев удалось получить информацию о хинонной структуре этих веществ. Кроме того, достоверно идентифицировали соматостатин и вазопрессин; у ряда больных — серотонин и гистамин в повышенных количествах.

Типичные спектрограммы общего пула суспензии эритроцитов доноров и больных представлены на рис. 2.

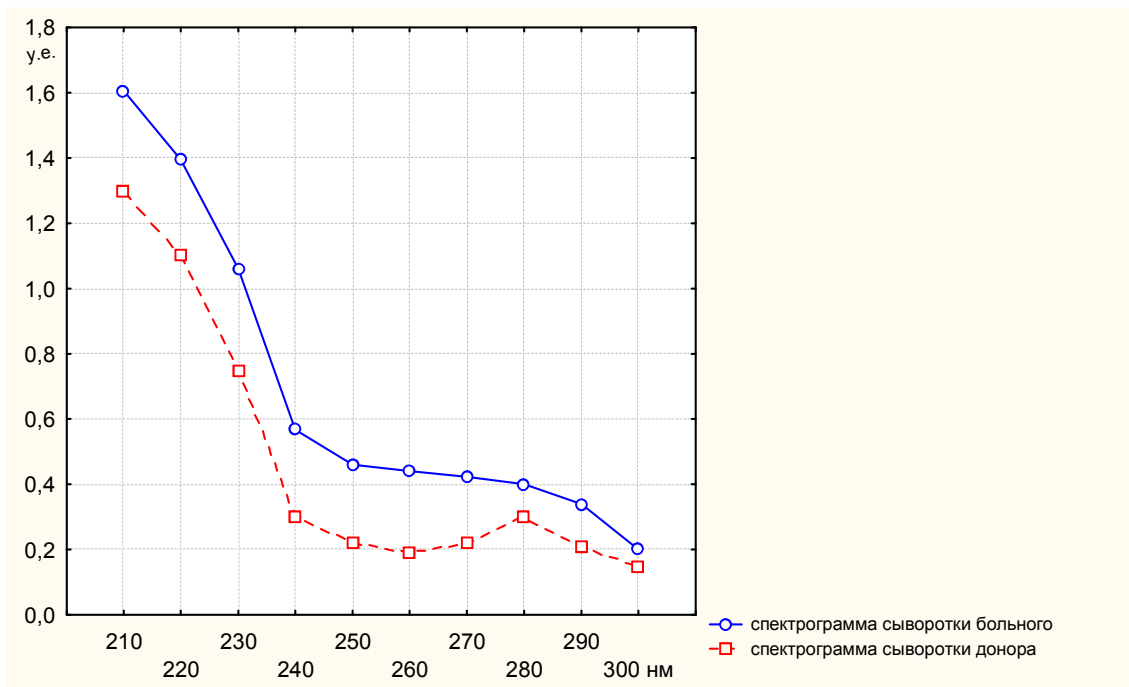


Рис. 1. Спектрограммы сыворотки крови больных ВЗК и здоровых доноров.

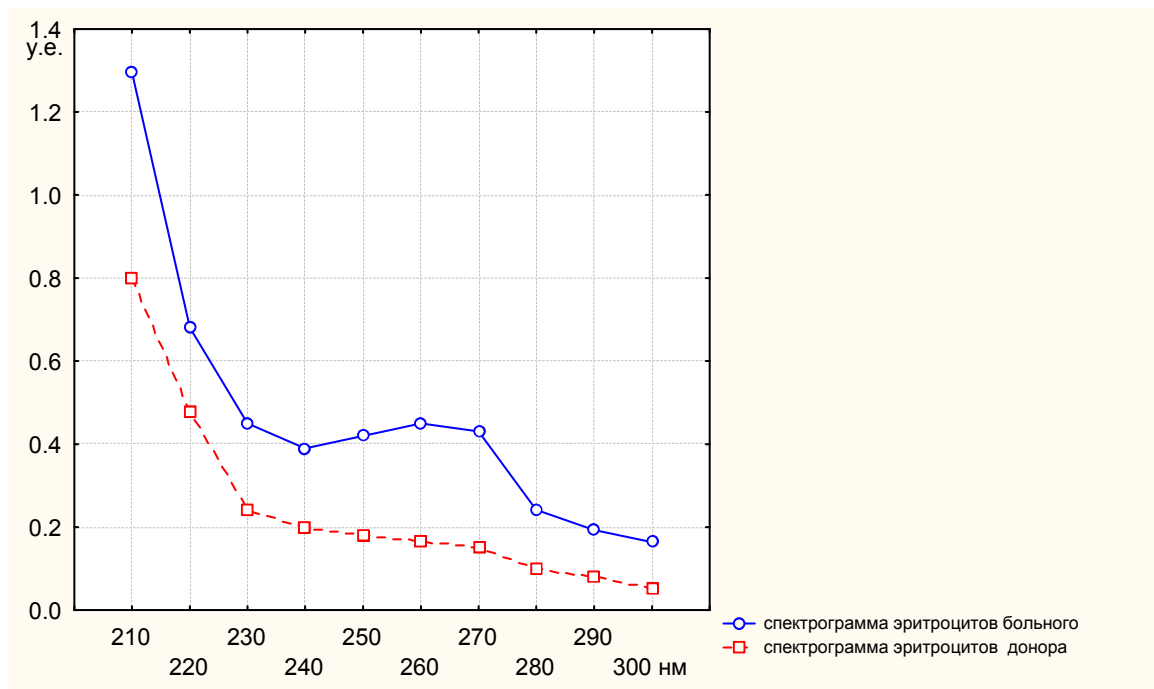


Рис. 2. Спектрограммы эритроцитов больных ВЗК и здоровых доноров.

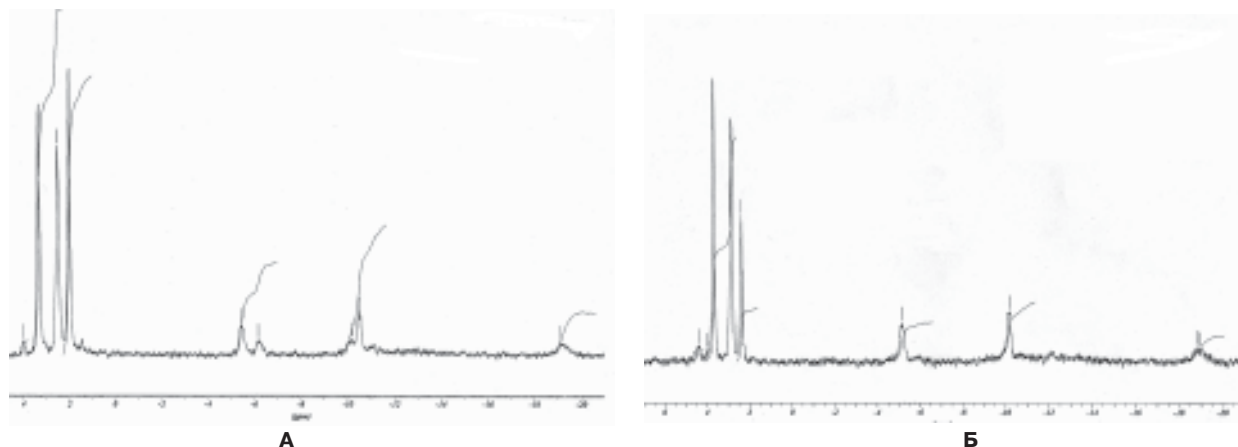


Рис. 3. ЯМР-спектрограммы эритроцитов больных ВЗК (А) и здоровых доноров (Б).

Значимые изменения имеют место в спектре адениловых нуклеотидов (260 – 290 нм). Это вызвало необходимость определить концентрации АТФ, неорганического фосфата (НФ), 2,3-дифосфоглицерата (ДФГ), монофосфата (МФ), поскольку именно эти соединения выделились как основные пики на ЯМР-спектрах мембран эритроцитов (рис. 3).

Увеличение количества неорганического фосфата мы расценили как снижение активности фермента 2,3-дифосфоглицерата. Известно, что 2,3-дифосфоглицерат выполняет несколько функций:

- является основным фосфоросодержащим соединением и служит важным анионом, уравновешивающим внутриклеточные катионы;
- действует как буферный агент;
- служит резервом при чрезвычайных ситуациях, когда клетка не имеет запасов креатинфосфата и гликогена;

- связывается с гемоглобином, уменьшая его сродство к кислороду и облегчая его освобождение в тканях.

Фосфоглюконатный путь в норме составляет лишь небольшую долю в общем катаболизме глюкозы, но в условиях повышения потребности в НАДФ.Н. Эритроцитам нужен НАДФ.Н для того, чтобы поддерживать глутатион в его восстановленной S-H-форме и, следовательно, воздействие агентов, ускоряющих окисление глутатиона в S-S-форму, активизирует реакции фосфоглюконатного пути, которые обеспечивают поступление компенсирующих восстановительных эквивалентов в форме НАДФ.Н. Значение углеводного и энергетического обменов для функции эритроцитов значимо при процессах, ведущих к гемолизу и анемии. Чаще всего они связаны с недостаточностью тех или иных ферментов в эритроцитах: фосфофруктокиназы, пируваткиназы, глюкозо-6-фосфат-

Компоненты фосфорного спектра ЯМР эритроцитов

	НФ*	ДФГ*	АТФ	МФ
Больные	21,26 ± 1,9	49,32 ± 2,6	27,39 ± 0,41	2,01 ± 0,14
Доноры	10,99 ± 0,09	56,17 ± 1,6	29,57 ± 0,6	2,6 ± 0,23

Примечание: * – значимые различия по критерию согласия ($p < 0,05$).

гидрогеназы. Пораженные клетки накапливают в избытке 2,3-дифосфоглицерат, но из-за недостаточности киназ не могут использовать его для образования АТФ (табл. 1).

Полученные данные свидетельствуют о нарушении энергозависимых процессов в клеточных мембранах у больных ВЗК. Это подтверждается также снижением уровня восстановленного глутатиона у этих пациентов. Энергетическое состояние эритроцитов и гепатоцитов обеспечивает у больных ВЗК своеобразие метаболических процессов биотрансформации. Полученные данные по антипириновому тесту (снижение клиренса и увеличение времени полувыведения антипирина) свидетельствуют о нарушении монооксигеназной системы печени и, учитывая выявленные изменения клеточных мембран эритроцитов, представляется логичным предполагать повреждения мембран гепатоцитов у больных ВЗК. Эффект контроля, осуществляемый в клетке путем энергетических сдвигов, находит отражение в соотношениях адениловых нуклеотидов, участвующих в гликолизе. Выявленный недостаток энергетических ресурсов в клетке способствует изменению ее внутреннего состава и на-

рушению целостности мембраны. Деформация мембраны эритроцита приводит к тому, что селезенка «расценивает» такие клетки как абнормальные, они устраняются из кровотока и разрушаются. Это один из механизмов анемии, которая сопровождает всех наблюдаемых нами пациентов и объясняет частый гемолиз эритроцитов, приводя порой к невозможности их исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявлены значимые различия в структуре клеточных мембран у больных воспалительными заболеваниями толстой кишки и здоровых людей, в основном за счет спектра адениловых нуклеотидов. Высокий уровень эндогенной интоксикации обуславливает нарушение метаболической функции печени у исследуемой группы пациентов.

Токсический пул, характеризующий тяжесть эндогенной интоксикации, представлен сложным комплексом веществ хинонной природы и низкомолекулярных соединений, содержащих пептидные фрагменты, и вызывает повреждение мембран клеток, т.к. указанные соединения являются поставщиками кислородных радикалов.