

УДК 616.34-002.253

М. В. Горіла, Т. І. Сергієнко, І. В. Кленіна, О. М. Стадник, Н. І. Штеменко

*Дніпропетровський національний університет ім. Олесь Гончара
Інститут гастроентерології НАМН України*

ЗМІНИ МЕМБРАННИХ БІЛКІВ ЕРИТРОЦИТІВ ПРИ БЕЗКАМ'ЯНОМУ ХОЛЕЦИСТИТІ ТА ХВОРОБИ КРОНА

Виявлено зміни білків еритроцитів крові людини при гастроентерологічних патологіях (безкам'яному холециститі та хворобі Крона). Як модель взято еритроцит. Зміни білків еритроцитів у пацієнтів із даними патологіями вивчено за допомогою електрофоретичного методу в поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію. При захворюваннях печінки (безкам'яний холецистит) і хворобах тонкого кишковика (хвороба Крона) у групах пацієнтів відбуваються кількісні зміни мембранних білків еритроцитів. При цьому вміст високомолекулярних білків (спектрини α та β) знижується, а при хворобі Крона зміни не реєструються. Вміст низькомолекулярних білків (аніонтранспортний білок і білок смуги 4.5) значно підвищений порівняно з контролем (група практично здорових людей). Виявлено зміни у структурі мембран еритроцитів, що призводять до порушення функцій білків цитоскелета. Результати дослідження докладніше пояснюють причини виникнення цих патологій.

М. В. Горелая, Т. И. Сергиенко, И. В. Кленина, О. М. Стадник, Н. И. Штеменко

*Днепропетровский национальный университет им. Олесь Гончара
Институт гастроэнтерологии НАМН Украины*

ИЗМЕНЕНИЯ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ БЕСКАМЕННОМ ХОЛЕЦИСТИТЕ И БОЛЕЗНИ КРОНА

Выявлены изменения белков эритроцитов крови человека при гастроэнтерологических патологиях (при бескаменном холецистите и болезни Крона). В качестве модели взят эритроцит. Изменение содержания белков эритроцитов у пациентов с данными патологиями изучено с помощью электрофоретического метода в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. При заболеваниях печени (бескаменный холецистит) и болезнях тонкого кишечника (болезнь Крона) в группах пациентов происходили количественные изменения мембранных белков эритроцитов. При этом содержание высокомолекулярных белков (спектрини α и β) снижалось, а при болезни Крона изменения отсутствовали. Содержание низкомолекулярных белков (анионтранспортный белок и белок полосы 4.5) значительно повышалось по сравнению с контролем (группа практически здоровых людей). Выявлены изменения в структуре мембран эритроцитов, которые приводят к нарушению функций белков цитоскелета. Результаты исследования объясняют причины возникновения этих патологий.

М. V. Gorelaya, T. I. Sergienko, I. V. Klenina, O.M. Stadnik, N. I. Shtemenko

*Oles' Honchar Dnipropetrovsk National University
Research Institute of Gastroenterology of Academy of Medical Sciences of Ukraine*

MEMBRANE ERYTHROCYTE PROTEINS CHANGES UNDER NONCALCULOUS CHOLECYSTITIS AND CROHN'S DISEASE

The aim of the investigation was to reveal the changes in erythrocytes' proteins from human blood under gastroenterological pathologies, namely noncalculous cholecystitis and Crohn's disease. The erythro-

cyte was used as a model system. The PAAG electrophoresis with SDSNa method was used. Erythrocyte membrane proteins quantitative changes were observed in patient groups under liver and intestines diseases. High molecular weight proteins content (spectrines α and β) was reduced, but any changes were not registered under the Crohn's disease. Low molecular weight proteins content (anion-transporting protein and protein band 4.5) increased considerably as compared with a control (healthy people group). The structure of erythrocytes' membrane changed, that led to disturbance of function of cytoskeleton proteins. The research results give more wide explanations of the pathologies genesis.

Вступ

Сучасна гастроентерологія – наука, яка активно розвивається і за останні десятиріччя збагатилася новими принциповими відкриттями. До захворювань органів травлення відносять велику кількість функціональних захворювань стравоходу, шлунка, жовчного міхура, кишковика. На сьогоднішній день отримано багато даних щодо нових механізмів ушкодження печінки, діагностики захворювань, лікування хворих, оцінки прогнозу захворювань [1–3; 10; 13].

Досить актуальним і важливим для подальшого розвитку багатьох наук та їх напрямів є дослідження крові та її формених елементів у розвитку процесів патології. Біохімічне вивчення крові людини при різних захворюваннях дає ширші пояснення тих або інших причин виникнення цих патологій [5; 8; 9; 11; 12]. Вивчення структури мембрани еритроцита людини й, насамперед, складу білків є актуальним, оскільки ряд спадкових патологій (сфероцитарні анемії, міодистрофії, деякі захворювання центральної нервової системи) характеризуються різними порушеннями білкового складу мембрани еритроцита і, як наслідок, порушенням її структурно-функціональної організації. Мембрана еритроцита протягом тривалого часу уявлялася дослідниками лише як оболонка, що відокремлює гемоглобін від плазми. Роль мембрани у функціонуванні цієї високоспеціалізованої клітини, здавалося, обмежується тільки здатністю бути проникною для газів крові [14]. Однак успіхи, досягнуті в мембранології за останні роки й, зокрема, у вивченні мембрани еритроцита ссавців за допомогою біохімічних і біофізичних методів, змушують у цей час по-іншому поглянути на роль мембрани в роботі клітини [15]. Через свою спеціалізацію еритроцит за механічними властивостями є унікальною клітиною, тому, що на відміну від інших клітин, постійно піддається вираженим деформувальним впливам у кровоносному руслі [4].

Таким чином, у підтриманні структурної цілісності еритроцитів велике значення мають внутрішні примембранні білкові шари, структура та взаємодія яких з еритроцитарними мембранами взаємно зумовлені [6; 11]. У плазматичній мембрані еритроцитів людини ідентифіковано близько 15 головних білків із молекулярною масою від 15 тис. до 250 тис. Да. Три з них – спектрин, глікофорин, білок смуги 3 – складають у сумі за вагою понад 60 % усіх мембранних білків. Плазматичну мембрану еритроцитів треба розглядати як відкриту динамічну структуру, здатну специфічно та неспецифічно зв'язувати білки плазми крові та цитозоль еритроцитів [6; 7].

Актуальність проблеми хронічних неспецифічних захворювань кишок зумовлюється збільшенням в останнє десятиріччя захворювань осіб молодого працездатного віку (оскільки пік захворювання найвищий у віковій групі від 20 до 30 років), а також серйозними ускладненнями, які призводять до втрати працездатності та інвалідності у молодому віці [8; 10].

Актуальність проблем сучасної гастроентерології спричинена підвищенням захворюваності та поширеності патології органів травлення, їх прогресуючим перебігом, що призводить до погіршення якості життя, інвалідизації та смерті хворих.

Мета роботи полягала у з'ясуванні змін мембранних білків еритроцитів крові людей, які хворіють на безкам'яний холецистит та хворобу Крона.

Матеріал і методи досліджень

Для даного дослідження брали кров людей, хворих на безкам'яний холецистит і хворобу Крона (хвороба тонкого кишковика) та людей без синдромів даних захворювань на момент огляду. Контрольну групу складали 3 особи чоловічої статі та 3 особи жіночої статі (25–35 років). До групи людей, які хворіють на хворобу печінки (безкам'яний холецистит) входили як чоловіки, так і жінки (віком 35–50 років), 4 особи жіночої та 5 – чоловічої статі. До групи пацієнтів, які страждають на хворобу Крона, входило 2 особи жіночої та 2 – чоловічої статі (віком 35–55 років). Як об'єкт дослідження обрали форменні елементи крові – еритроцити.

З еритроцитів виділяли плазматичні мембрани. А за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію визначали склад білків мембран еритроцитів. Потім вивчали відмінності білкових фракцій хворих людей від практично здорових. Для отримання «тіней» еритроцитів брали гепаризовану кров (6 мл) [15]. Загальний білок визначали методом Лоурі. Статистичну обробку даних проводили із використанням критерію Стьюдента [7].

Результати та їх обговорення

У результаті проведення дослідів одержали електрофореграми. Основними фракціями в поліакриламідному гелі виявилися: спектрин α , спектрин β , анкірин 1, анкірин 2, білок смуги 3, білок смуги 4.5. За допомогою пристрою «Денситометр» проводили денситометрію. З аналізу денситограм отримали дані про відсотковий вміст білкових фракцій (табл. 1 та 2).

Таблиця 1

Білковий спектр (%) еритроцитів крові хворих на безкам'яний холецистит

Фракції, %	Контрольна група	Безкам'яний холецистит
Спектрин α	10,30 ± 0,70	3,38 ± 1,70 *
Спектрин β	10,30 ± 0,30	3,04 ± 1,35 *
Анкірин 1	12,60 ± 0,20	7,70 ± 0,94
Анкірин 2	18,50 ± 0,50	16,49 ± 1,28
Білок смуги 3	19,60 ± 0,70	30,81 ± 3,23 **
Інтегральний білок смуги 4.5	28,70 ± 0,40	38,74 ± 2,78 **

Примітки: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ – вірогідність змін між показниками хворих порівняно з групою контролю.

Таблиця 2

Білковий спектр (%) еритроцитів крові пацієнтів із хворобою Крона

Фракції, %	Контрольна група	Хвороба Крона
Спектрин α	10,30 ± 0,70	0 ± 0**
Спектрин β	10,30 ± 0,30	0 ± 0**
Анкірин 1	12,60 ± 0,20	10,30 ± 0,78
Анкірин 2	18,50 ± 0,50	20,30 ± 0,94
Аніонтранспортний білок	19,60 ± 0,70	26,80 ± 1,07*
Інтегральний білок смуги 4.5	28,70 ± 0,40	39,60 ± 0,52**

Примітки: див. табл. 1.

У хворих на безкам'яний холецистит достовірні зміни білкового спектра еритроцитів крові стосувались усіх фракцій: спектринів α та β , анкіринів 1 та 2, білків смуги 3 та 4.5. Вміст високомолекулярних пептидів (спектринів, анкіринів) значно знижувався

порівняно з контрольною групою, а низькомолекулярних – підвищувався. Слід відзначити, що у 88 % групи хворих на безкам'яний холецистит значно підвищений синтез низькомолекулярних пептидів: смуг 3 та 4.5 – в 1,4 раза до 53,4 %, що призвело до пригнічення синтезу високомолекулярних пептидів (див. табл. 2).

У хворих на хронічні неспецифічні захворювання кишок вірогідні зміни білкового спектра еритроцитів крові людини стосувались усіх фракцій. Високомолекулярні білки, спектрини α і β не визначалися, відсотковий вміст анкірину незначно знижувався. Відсотковий вміст низькомолекулярних пептидів підвищувався порівняно з контрольною групою. Слід зазначити, що у 100 % пацієнтів не визначали білки смуги 1 та 2. Також у всіх пацієнтів групи підвищувався вміст низькомолекулярних білків у 1,4 раза до 40 %.

Таким чином, для хворих на хронічні неспецифічні захворювання кишок характерна гіпопротеїнемія, викликана недостатнім надходженням білкових продуктів, а також виходом білка за межі судин (через нирки, шлунково-кишковий тракт – при гастроентеритах тощо).

У групі хворих на безкам'яний холецистит і хворобу Крона в еритроцитах порушувалося утворення двомірної сітки, до якої кріпляться актинові олігомери. Зменшення концентрації спектринів або повна їх відсутність могла призводити до змін форми клітин (еліптоцитоз, сфероцитоз) і порушувати рухливість інтегральних білків [12].

У результаті отримані дані, що свідчили про таке. Для 100 % хворих на безкам'яний холецистит характерні зміни білкового спектра еритроцитів крові стосувались усіх фракцій. Особливо помітно змінювалися білки смуг 3 та 4.5. У групі хворих на безкам'яний холецистит у 88 % пацієнтів спостерігалось підвищення вмісту білків смуги 3 та 4.5 в 1,4 раза від контрольної групи (53,4 %). У пацієнтів із хронічними неспецифічними захворюваннями кишок, на відміну від хворих на безкам'яний холецистит, високомолекулярні білки, спектрини α і β не реєструвалися, відсотковий вміст анкірину незначно знижувався. Відсотковий вміст низькомолекулярних пептидів, як і в групі хворих на безкам'яний холецистит, підвищувався порівняно з контрольною групою. Група пацієнтів із хворобою Крона характеризувалася гіпопротеїнемією, оскільки у 100 % хворих не виявлялися спектрини.

Через знижений вміст спектринів (у хворих на безкам'яний холецистит 7,0 %, у пацієнтів із хворобою Крона не реєструвався) могла змінюватися форма клітин і рухливість інтегральних білків, що, в свою чергу, порушувало транспорт аніонів, глюкози та нуклеозидів через мембрану еритроцитів.

Вміст анкіринів змінювався незначно. У групі хворих на безкам'яний холецистит спостерігалось зниження вмісту анкірину 1 на 4,9 %. Вміст анкірину 2 у групі пацієнтів із безкам'яним холециститом знизився на 2,0 %, а в групі хворих із хворобою Крона – підвищився на 1,8 %.

Вміст білків смуг 3 та 4.5 значно відрізнявся від контролю. Білок смуги 3 у групі хворих на безкам'яний холецистит підвищувався на 11,2 %, у групі із хворобою Крона також підвищувався на 7,2 %. Білок смуги 4.5 у групі хворих на безкам'яний холецистит підвищувався на 10,4 %, а в групі з хворобою Крона – підвищувався на 10,9 %.

Висновки

Для всіх хворих на безкам'яний холецистит характерне підвищення вмісту низькомолекулярних пептидів (білки смуг 3 та 4.5) і зниження вмісту високомолекулярних білків (спектринів α та β). Зменшений вміст цих білків пов'язаний із гіпопротеїнемією через недостатній синтез і надмірний вихід білків через судини. Для всіх пацієнтів із хво-

роботою Крона спектрини α та β не виявлені. Тому у хворих спостерігалася гіпопротеїнемія, яка виникала в результаті значних кровотеч у кишковому, втраті рідин. Зареєстровано також підвищений вміст низькомолекулярних білків (вміст білка смуги 3 підвищувався на 7,2%; смуги 4.5 – на 10,9%). Спектрини α та β на основі даного дослідження можна використовувати як білки-маркери для виявлення хвороби Крона. На підставі отриманих результатів виявлено зміни структури мембран еритроцитів, що призводять до порушення функцій білків цитоскелета клітин крові людини.

Бібліографічні посилання

1. **Воробьев Г. И.** Клинико-морфологическая характеристика сегментарного поражения при язвенном колите // Г. И. Воробьев, И. Л. Халиф, Н. С. Малахова // Клиническая медицина. – 2007. – № 1. – С. 44–47.
2. **Гончарик И. И.** Клиническая гастроэнтерология (болезни пищевода, желудка, кишечника). – Мн. : Ураджай, 2002. – 335 с.
3. **Ивашкин В. Т.** Неспецифический язвенный колит: диагностические и прогностические критерии / В. Т. Ивашкин, А. М. Осадчук // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2003. – Т. 11, № 5. – С. 60–66.
4. **Казеннов А. М.** Роль белков мембранного скелета безъядерных эритроцитов в функционировании мембранных ферментов / А. М. Казеннов, М. Н. Маслова, А. Д. Шагабодов // Докл. АН СССР. – 1990. – Т. 312, № 1. – С. 223–226.
5. **Камышников В. С.** Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. В 2 т. – Минск : ООО Беларусь, 2000. – 465 с.
6. **Курята А. В.** Полипептидный и пептидный состав мембран эритроцитов у пациентов с гипертонической болезнью с различной активностью *Na/K*-АТФазы / А. В. Курята, В. С. Недзвецкий // Український медичний часопис. – 1999. – № 3 (11). – С. 110–115.
7. **Лакін Г. Ф.** Биометрия. – М. : Высш. шк, 1990. – 352 с.
8. **Логинов А. С.** Болезни кишечника. – М. : Медицина, 2000. – 210 с.
9. **Назаренко Г. И.** Клиническая оценка результатов лабораторных исследований / Г. И. Назаренко, А. А. Кишкун. – М. : Медицина, 2002. – 541 с.
10. **Никитина Н. А.** Болезнь Крона с локализацией процесса в тонкой кишке / Н. А. Никитина, Е. А. Білоус // Врач. – 2002. – № 2. – С. 21–23.
11. **Новицкий В. В.** Физиология и патология эритроцита. – М. : Томск, 2004. – 200 с.
12. **Солодилова М. А.** Роль генетических и средовых факторов в детерминации количественного содержания основных белков мембран эритроцитов человека: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – М. : 1999. – 18 с.
13. **Харченко Н. В.** Деякі проблеми сучасної гастроентерології // Український медичний часопис. – 2003. – № 5. – С. 68–73.
14. **Яковенко Э. П.** Хронические заболевания печени: диагностика и лечение / Э. П. Яковенко, П. Я. Григорьев // Рос. мед. журн. – 2003. – Т. 11, № 5. – С. 291–296.
15. **Якубова Р. Р.** Способ оценки дестабилизации мембран эритроцитов / Р. Р. Якубова, А. В. Мурин // Лаб. дело. – 1990. – № 5. – С. 26–29.

Надійшла до редколегії 01.10.2010