

Биол. журн. Армении, 3-4 (59), 2007

УДК 548.75:539.23:578.742

ИССЛЕДОВАНИЕ ПЛАЗМЫ И ЭРИТРОЦИТОВ БОЛЬНЫХ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ КРОВИ МЕТОДОМ ИК СПЕКТРОСКОПИИ С ФУРЬЕ ПРЕОБРАЗОВАНИЕМ

Н.Г. МКРЯН, Л.Г. МЕЛИК-ОГАНДЖАНИН, Ш.А. МАРКАРЯН,
Г.М. ГАЛЮН, П.А. КАЗАРЯН

Ереванский государственный университет, 0025

Гематологический центр им. проф. Р.О. Еоляна МЗ РА, Ереван, 0014

Методом ИК спектроскопии с Фурье преобразованием изучали плазму и эритроциты крови здоровых людей, а также больных миелопролиферативными заболеваниями - эритремией и хроническим миелобластным лейкозом (ХМЛ). Показано, что спектры плазмы и эритроцитов крови здоровых и больных людей существенно различаются. На основании выявленных различий даны описания изменений химического состава плазмы и эритроцитов при хронических лейкозах на молекулярном уровне. Эти изменения плазмы крови можно объяснить качественными и количественными изменениями фосфолипидов, холестерина, триглицеридов, жирных кислот, протеинов и глюкозы. Изменения в ИК спектрах эритроцитов при эритремии связаны с резким увеличением числа эритроцитов и их химических компонентов в крови больных.

Ֆուրյե ձևափոխմամբ ԻԿ սպեկտրոսկոպիայի մեթոդով ուսումնասիրել ենք առողջ մարդկանց, էրիթրեմիայով ու խրոնիկ միելոբլաստային լեյկոզով (ԽՄԼ) տառապող հիվանդների արյան պլազման և էրիթրոցիտները: Ցույց է տրված, որ առողջ և հիվանդ մարդկանց արյան պլազմայի և էրիթրոցիտների սպեկտրերը խափա տարբերվում են: Դիտված տարբերությունների հիման վրա մոլեկուլային մակարդակով դրվել են խրոնիկ լեյկոզով տառապող հիվանդների արյան պլազմայի և էրիթրոցիտների քիմիական քաղաղրության փոփոխության նկարագրությունը: Արյան պլազմայի այդ փոփոխությունները կարելի է բացատրել ֆոսֆոլիպիդների, խոլեստերինի, տրիգլիցերիդների ճարպաթթուների, պրոտեինների և գլյուկոզի որակական ու քանակական փոփոխություններով: Էրիթրեմիայով հիվանդների արյան էրիթրոցիտների ԻԿ սպեկտրերում փոփոխությունները կապված են հիվանդի արյան մեջ էրիթրոցիտների և դրանց քիմիական կոմպոնենտների թվի կտրուկ մեծացման հետ:

Blood plasma and erythrocytes obtained from healthy people and patients suffering from myeloproliferative diseases - erythremia and chronic myeloid leukemia (CML) have been investigated using Fourier Transform Infrared (FT IR) spectroscopy. The results obtained showed some notable differences between spectra of blood components obtained from the patients compared to healthy controls. The observed phenomena have been described on the basis of changes in chemical composition of blood plasma and erythrocytes in cases of chronic myeloid leukemia and erythremia at the molecular level. It has been considered that quantitative and qualitative alterations of phospholipids, lipids, proteins, glucose, cholesterol, triglycerids are caused by changes in blood plasma composition. IR spectra changes of erythrocytes obtained from patients suffering from erythremia are related to high increase in quantity of red cells in blood.

*Плазма - эритроциты - Фурье преобразование - ИК спектроскопия -
миелопролиферативные заболевания*

В настоящее время методы ИК спектроскопии и микроспектроскопии с Фурье преобразованием (ФП) все чаще стали применяться в биологии и биохимии для описания структур и конформаций белков [4], нуклеиновых кислот [14], липидов [5], в медицине при изучении различных онкологических заболеваний, таких как рак легких, шейки матки, а также молочной железы [7] и желудка [2].

Известно, что при заболеваниях меняется химический состав тканей, клеток, крови, и исследование состава крови позволяет обнаружить патологические изменения организма, во многом облегчая лечение болезней. В работах [1, 6, 8, 10, 12, 13, 15] методом ФП ИК спектроскопии в плазме крови и в крови определены содержания глюкозы, фосфолипидов, триглицеридов, холестерина, белков, мочевины и сделаны соответствующие отнесения полос поглощения к тем или иным группам, входящим в состав крови.

Есть работы, посвященные исследованию плазмы крови больных лейкозом [9]. Эта тема исследований особенно актуальна, так как лейкоз является одной из основных причин повышения смертности в мире и очень важен его ранняя диагностика и лечение [11].

В данной работе впервые представлены исследования ФП ИК спектров плазмы крови и эритроцитов больных эритремией и хроническим миелобластным лейкозом.

При миелопролиферативных заболеваниях, в частности при эритремии, наблюдается повышение числа эритроцитов, гемоглобина, массы и вязкости циркулирующей крови, а также ее свертывание [11].

Хронический миелобластный лейкоз (ХМЛ) характеризуется нарушением нормального созревания гранулоцитарных лейкоцитов, появлением очагов вискозно-мозгового кроветворения [11].

Целью работы было показать, что спектры плазмы и эритроцитов больных отличаются от таковых здоровых людей, по возможности описать изменения химического состава плазмы и эритроцитов при данных патологических процессах на молекулярном уровне. В работе даны и основные отнесения всех полос поглощения ИК спектров плазмы и эритроцитов.

Материал и методика. Были исследованы образцы плазмы крови и эритроцитов 9 здоровых (доноров) и 4 взрослых больных методом ИК спектроскопии с Фурье преобразованием с приставкой нарушенного полного отражения (НПО).

Образцы плазмы и эритроцитов крови были предоставлены Гематологическим центром им. проф. Р. О. Еоляна МЗ РА.

Плазма и эритроциты крови были разделены следующим образом. В пробирки с кровью добавляли гепарин, чтобы предотвратить ее свертывание. Эритроциты от плазмы отделяли центрифугированием при 3000 об/мин. После двукратной отмывки изотоническим раствором NaCl (0,9%) и при центрифугировании в том же режиме получали плазму и эритроциты, которые использовали в дальнейших исследованиях.

ИК спектры образцов регистрировали с помощью спектрометра Nicolet/FT IR NEXUS, в области 4000-600 см⁻¹, при 32 параллельных сканах и разрешении 4 см⁻¹ с использованием приставки НПО из кристалла ZnSe.

Для получения ИК спектров разлессенные образцы плазмы и эритроцитов помещали на кристалл ZnSe и при комнатной температуре ($\approx 25^\circ$) в ламинарном потоке воздуха сушили примерно 1 ч [6, 10].

Особое внимание уделялось очистке кристалла. Как известно [6, 10], белки компонентов крови адсорбируются на поверхности кристалла ZnSe, что может привести к получению неточных результатов. Поэтому после получения спектра каждого образца кристалл тщательно очищали водой, затем ацетоном.

Для получения воспроизводимых данных спектры были нормированы по отношению к интенсивности полосы амид I (карбонильное поглощение).

Результаты и обсуждение. Чтобы лучше понять и описать патологические изменения организма при онкологических заболеваниях кроветворной системы, которые неразрывно связаны с изменениями химического состава плазмы и эритроцитов, необходимо также дать по возможности полное описание ИК спектров плазмы и эритроцитов крови здоровых людей.

Таблица 1. Характеристические частоты плазмы и эритроцитов крови и их отнесения, см^{-1}

$\leftrightarrow$ (см^{-1})	Отнесения
3462	$\leftrightarrow$ свободные $-\text{OH}$ и $-\text{NH}$
3417	$\leftrightarrow$ свободные транс $-\text{NH}$
3288	$\leftrightarrow$ связанные транс $-\text{NH}$
3207(3192)	$\leftrightarrow$ связанные $-\text{OH}$ и $-\text{NH}$
3020-3000	$\leftrightarrow$ $-\text{CH}_2$; ненасыщенные жирные кислоты, сложные эфиры холестерина
2990-2950	$\leftrightarrow$ $-\text{CH}_2$; сложные эфиры холестерина, триглицериды
2950-2880	$\leftrightarrow$ $-\text{CH}_2$; жирные кислоты, фосфолипиды
2880-2860	$\leftrightarrow$ $-\text{CH}_2$; сложные эфиры холестерина, триглицериды, глицерол
2870-2830	$\leftrightarrow$ $-\text{CH}_2$; жирные кислоты, фосфолипиды
2996-2819	$\leftrightarrow$ $-\text{CH}_2$, $\leftrightarrow$ $-\text{CH}_2$, $\leftrightarrow$ $-\text{CH}_2$, $\leftrightarrow$ $-\text{CH}_2$; жирные кислоты, фосфолипиды, триглицериды
1739-1732	$\leftrightarrow$ $-\text{C}=\text{O}$; липиды, сложные эфиры холестерина, триглицериды
1720-1600	Amide I ($\leftrightarrow$ $-\text{C}=\text{O}$) $\rightarrow$ спираль белков
1630-1560	$\leftrightarrow$ $-\text{NH}_2$; аминокислоты
1600-1480	Amide II ($\leftrightarrow$ $-\text{N}-\text{H}$), $\rightarrow$ спираль белков
1480-1430	$\leftrightarrow$ $-\text{CH}_2$, $\leftrightarrow$ $-\text{CH}_2$, $\leftrightarrow$ $-\text{CH}_2$, $\leftrightarrow$ $-\text{CH}_2$; жирные кислоты, фосфолипиды, триглицериды
1430-1360	$\leftrightarrow$ $-\text{COO}^-$; аминокислоты
1342(1339)	$\leftrightarrow$ $-\text{C}-\text{N}$ связанных с ароматическими кольцами
1330-1200	Amide III, $\leftrightarrow$ $-\text{C}-\text{N}$, $\leftrightarrow$ $-\text{N}-\text{H}$ и $-\text{CH}_2$
1311(1300)	$\leftrightarrow$ $-\text{NH}_2$
1244(1241)	$\leftrightarrow$ $-\text{C}-\text{OH}$, аспетатные группы, $\leftrightarrow$ $-\text{C}-\text{O}$, $\rightarrow$ $(\text{O}-\text{P}-\text{O})$ (PO_4)
1170	$\leftrightarrow$ $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{P}$; фосфолипиды
1165	$\leftrightarrow$ $-\text{CO}-\text{O}-\text{C}$, $\leftrightarrow$ $-\text{C}-\text{OH}$; жирные кислоты
1152	$\leftrightarrow$ $-\text{C}-\text{O}$, $\leftrightarrow$ $-\text{C}-\text{OH}$ углеводов
1125	маятниковые колебания $-\text{CH}$ ароматических систем
1104	$\leftrightarrow$ $-\text{C}-\text{O}-\text{C}$ 5,6-членных циклов сахаров
1084(1076)	$\leftrightarrow$ $-\text{O}-\text{P}=\text{O}$ (PO_4) и $\leftrightarrow$ $-\text{C}-\text{OH}$
1063	$\leftrightarrow$ $-\text{CO}-\text{O}-\text{C}$; фосфолипиды
1057	$\leftrightarrow$ $-\text{C}-\text{O}$; углеводы
1034(1030)	скелетные колебания $-\text{C}-\text{C}-\text{N}$

$\leftrightarrow$ валентные колебания, $\leftrightarrow$ деформационные колебания
 $\leftrightarrow$ симметричные, $\leftrightarrow$ асимметричные

В связи со сложным химическим составом и строением плазмы и эритроцитов существовала трудность расшифровки спектров плазмы и эритроцитов.

Основываясь на литературных данных [1, 8, 9, 14], нами представлены отнесения характеристических полос поглощений, которые приведены в табл. 1.

На рис. 1а и 1б представлены спектры плазмы и эритроцитов крови здоровых людей в интервале частот $3900-900\text{ см}^{-1}$.

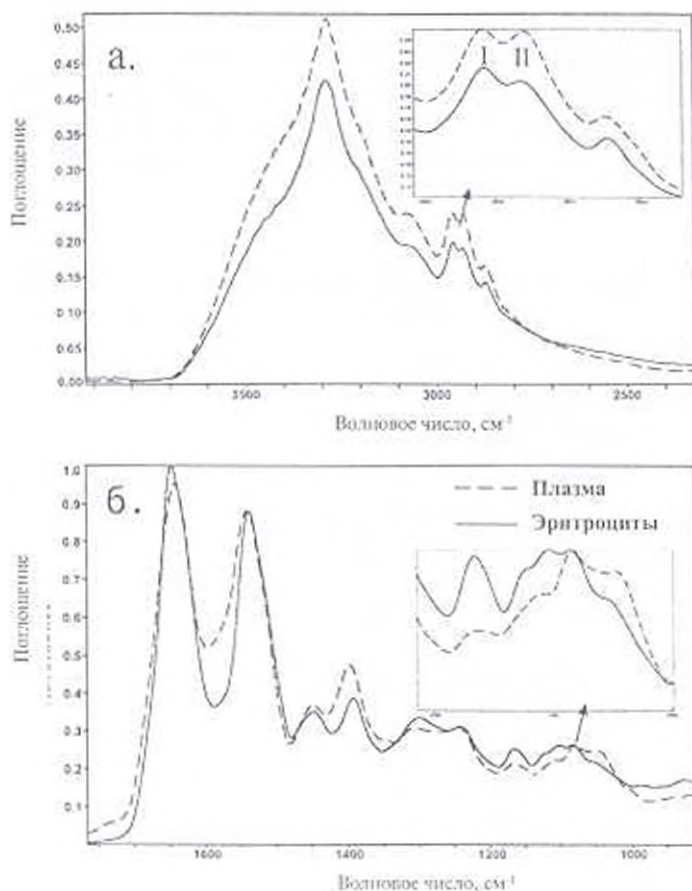


Рис. 1. ИК спектры плазмы и эритроцитов здоровых людей в областях а) $3900-2400\text{ см}^{-1}$ и б) $1800-900\text{ см}^{-1}$.

Сравнение спектров плазмы и эритроцитов крови здоровых людей в области $3900-2500\text{ см}^{-1}$ показало, что в этой области наиболее интенсивны поглощения плазмы крови.

Так как полученные данные имеют сложный характер, хорошим критерием может служить сравнение интенсивности определенных полос поглощений. Интересно отметить, что в случае плазмы отношение интенсивности полос I и II (рис. 1а) соответствует асимметричным валентным колебаниям CH_2 ($2958-2956\text{ см}^{-1}$) и CH_3 ($2934-2930\text{ см}^{-1}$) групп $\frac{I_I}{I_{II}} = 1$, а в

случае эритроцитов $\frac{I_{11}}{I_{11}} > 1$. В спектрах эритроцитов не проявляются полосы при 2854 см^{-1} , соответствующие симметричным валентным колебаниям CH_2 групп жирных кислот. Различна и интенсивность пиков асимметричных и симметричных деформационных колебаний CH_2 и CH_3 групп. Приведенные различия спектров указывают на то, что плазма и эритроциты крови имеют различное содержание жирных кислот, фосфолипидов и триглицеридов, т.е. различно отношение липиды/белки в плазме и эритроцитах. Изменение этого отношения в свою очередь может служить показателем степени заболевания [3].

Следует обратить внимание на различия в ИК спектрах плазмы и эритроцитов в области $1800\text{--}900 \text{ см}^{-1}$. Полоса поглощения при 1739 см^{-1} , обусловленная валентными колебаниями C=O групп жиров, триглицеридов, сложных эфиров холестерина, отсутствует в ИК спектрах эритроцитов. Однако основные изменения наблюдались в области $1200\text{--}1000 \text{ см}^{-1}$, где основной вклад имеют симметричные и асимметричные колебания O-P-O фосфолипидов, фосфорилированных белков, а также колебания C-O- групп углеводородов (увеличенный рис.16). Кроме того, в спектрах некоторых биологических объектов показателем содержания гликогена является отношение полос $1030 \text{ см}^{-1} / 1080 \text{ см}^{-1}$ [3], однако в спектрах эритроцитов полоса при 1030 см^{-1} отсутствует.

Далее нами исследовались образцы эритроцитов крови больных эритремией и ХМЛ. Анализ спектров в области $3900\text{--}900 \text{ см}^{-1}$ (рис.2) показал, что у больных эритремией наблюдается значительный рост интенсивности всех полос поглощений, по сравнению со спектрами эритроцитов здоровых людей, что возможно объяснить тем, что во время эритремии в крови больных резко возрастает количество эритроцитов.

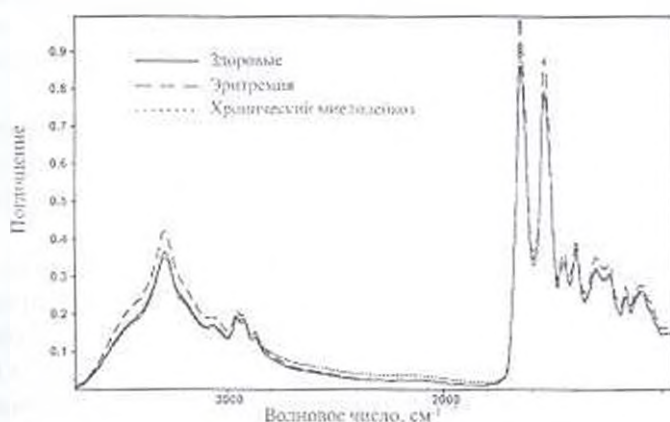


Рис. 2. ИК спектры эритроцитов здоровых и больных в области $3900\text{--}900 \text{ см}^{-1}$

Сравнение ФП ИК спектров образцов эритроцитов, полученных из крови здоровых и больных ХМЛ, показало что в ФП ИК спектрах этих

больших отсутствует слабая полоса при 1339 см^{-1} , которая обусловлена валентными колебаниями C-N связанных с ароматическими кольцами.

Далее исследовались образцы плазмы больных. При сравнении полученных спектров в области $3900\text{-}2500\text{ см}^{-1}$ особых изменений не наблюдалось. Однако в области $1800\text{-}900\text{ см}^{-1}$ наблюдались смещения в высокочастотную область полос поглощения валентных колебаний C=O групп липидов от 1739 до 1741 см^{-1} и симметричных деформационных колебаний NH_2 белков от 1302 до 1311 см^{-1} (рис.3).

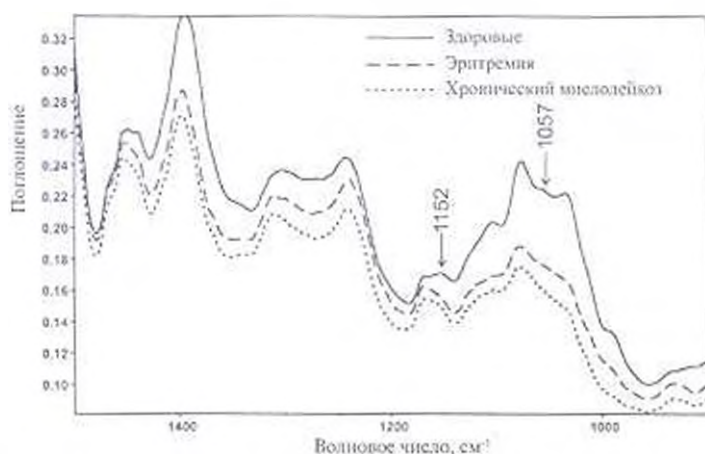


Рис. 3. ИК спектры плазмы доноров и больных в области $1500\text{-}900\text{ см}^{-1}$

В области $1500\text{-}1000\text{ см}^{-1}$ (рис. 3) у больных эритремией по сравнению со здоровыми и больными ХМЛ в плазме крови наблюдались уменьшение интенсивности всех полос поглощения, кроме того, у больных по сравнению со здоровыми наблюдались и смещение полосы поглощения при 1244 см^{-1} в низкочастотную область (1241 см^{-1}). Эти поглощения связаны с валентными колебаниями C-N протеинов, валентными асимметричными колебаниями PO_2 -фосфорилированных белков.

В спектрах плазмы крови больных отсутствовали полосы поглощения при 1152 и 1057 см^{-1} (рис.3). В работе [9] показано, что полоса при 1057 см^{-1} может являться специфическим биомаркером при различных лейкозах, в том числе и при ХМЛ.

Все представленные изменения плазмы крови можно объяснить качественными и количественными изменениями определенных макромолекул, входящих в состав плазмы крови, в основном фосфолипидов, протеинов, глюкозы, холестерина, триглицеридов. Характер этих изменений очень сложен и поэтому необходимо наиболее детальное изучение данного вопроса.

В связи с полученными данными объектами последующих исследований станут фосфолипиды, выделенные из плазмы и эритроцитов крови больных.

Таким образом, ФП ИК спектроскопия является быстрым и

эффективным методом исследования компонентов крови. При исследовании образцов плазмы крови наиболее информативной является область 1300-1000 см^{-1} , где основной вклад обусловлен колебаниями —O—P—O— групп фосфолипидов и —C—OH , —C—O— групп углеводов. А это означает, что при ХМЛ и эритремии содержание фосфолипидов и углеводов в плазме качественно и количественно изменяется. Кроме того, в связи со сложным характером наблюдаемых различий ФП ИК спектров компонентов крови больных по сравнению со здоровыми информативны также данные об интенсивности полос поглощений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Донец А.А., Маккавеева Е.В., Пахомов П.М. Физ. химия полимеров. 7, 147-148, 2001.
2. Шагидуллин Р.Р., Вандюкова И.И., Новаковский А.Р., Вандюков А.Е. Вопросы онкологии. 51, 2, 219-222, 2005.
3. Arduis G. Technology in Cancer Research and Treatment. 5, 2, 157-167, 2006.
4. Bramanti E., Benedetti E., Sagripanti A., Papineschi F., Benedetti E. Biopol., 41, 545-553, 1997.
5. Brandenburg K., Seydel U. Chem. Phys. Lipids, 98, 23-40, 1998.
6. Bittner A., Heise N., Koschinsky T., Gries F. Mikrochim. Acta [Suppl.], 14, 827-828, 1997.
7. Dukor R.K., Liebman N. M., Johnson B. Cell Mol. Biol., 44, 211-217, 1998.
8. Déleris G., Petitbois C. Vib. Spectr., 32, 129-136, 2003.
9. Erukhimovitch V., Talyshinsky M., Souprun Y., Huleihel M. Vib. Spectr., 40, 40-46, 2006.
10. Heise H., Bittner A. J. Mol. Struct., 348, 21-24, 1995.
11. Hakobyan Y., Nazaretyan M., Ghazaryan P. Dynamics of the acute leukemia in Armenia (1999-2002). Proceeding of the 2nd International young medics conference, Yerevan, 26, 2003.
12. Jackson M., Mantsch, H.H. In Handbook of Vibrational Spectroscopy, (Chalmers, J., Griffiths, D., ed.) 5, 3227-3301, 2002.
13. Janatsch G., Kruse-Jarres J., Marback R., Heise H. Anal. Chem, 61, 2016-2023, 1989.
14. Le Gall J.-M., Manfait M., Theophanides T. J. Mol. Struct., 242, 397-407, 1991.
15. Lily M., Simmons R. Anal. Chem., 71, 343-350, 1999.

Получено 28.11.2007