

ИЗУЧЕНИЕ ЖЕЛЧНЫХ КАМНЕЙ СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

А. А. Пичугина^{1*}, Л. В. Цыро¹, Д. А. Афанасьев²,
С. А. Киселев³, Ф. Г. Унгер¹

УДК 544.17:616.366-003.7

¹ Национальный исследовательский Томский государственный университет,
634050, Томск, просп. Ленина, 36, Россия; e-mail: alina.com9@mail.ru

² ООО “Научно-исследовательская организация “Сибур-Томскнефтехим”, Томск, Россия

³ ОАО “ТомскНИПИнефть”, Томск, Россия

(Поступила 15 апреля 2016)

Проведены исследования холестериновых желчных камней методами электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), рентгенофазового анализа (РФА) и ядерного магнитного резонанса (¹H ЯМР). Полученные результаты свидетельствуют об идентичности спектров холестериновых желчных камней. Методом ЭПР установлено наличие в желчных камнях частиц, содержащих открытые спин-орбитали, которые выступают центрами коллоидных частиц. Спектры ¹H ЯМР и данные РФА указывают на наличие в желчных камнях холестерина и структур перехода десмостерола, которые образуют оболочки вокруг спиновых центров.

Ключевые слова: электронный парамагнитный резонанс, ядерный магнитный резонанс, рентгенофазовый анализ, желчный камень, холестерин.

The cholesterol gallstones studies by the electron paramagnetic resonance (EPR), X-ray diffraction (XRD) and nuclear magnetic resonance (¹H ЯМР). The results indicated the identity of cholesterol gallstones spectra. In the bile stones, ESR method revealed the particles containing open spin-orbitals, which are the centers of colloidal particles. The spectra of ¹H ЯМР and XRD data indicate the presence of cholesterol and transition desmosterol in gallstones that form a shell around the spin centers.

Keywords: electron spin resonance, nuclear magnetic resonance, X-ray analysis, gallstone, cholesterol.

Введение. В настоящее время существует много гипотез о возникновении камней в желчном пузыре. Изменение секреции холестерина, фосфолипидов и желчных кислот приводит к перенасыщению желчи холестерином, что является основным фактором формирования желчных камней (ЖЧК) в желчном пузыре [1]. По мере того как во время хранения желчь концентрируется в желчном пузыре, везикулярная доля желчных липидов обогащается относительно холестерина. Количество холестерина, выделяемое печенью, иногда может превышать пропускную способность желчевыводящих липидов, вызывая перенасыщение желчи и ее метастабильность. Различные патогенные условия могут нарушить плотный баланс секреции липидов в желчных протоках, что приводит к гиперсекреции холестерина или относительно пониженной секреции желчных кислот, которые в свою очередь обуславливают зародышеобразование кристаллов холестерина [2]. Кристаллы холестерина хранятся в желчном пузыре, где они растут и конгломерируются с другими компонентами, такими как соли кальция, магния, а также кристаллы билирубина, что в конечном итоге приводит к образованию ЖЧК [3]. По химическому составу и морфологическим признакам ЖЧК подразделяют на три типа: холестериновые, пигментные и смешанные [4]. Самый распространенный — холестериновый тип ЖЧК, они состоят на 50 мас.% из холестерина. Патогенез ЖЧК сложен и непонятен, поэтому необходимо знать состав камней в желчном пузыре, присутствующих в различных видах и патологических со-

STUDY OF GALLSTONES BY SPECTROSCOPIC METHODS

A. A. Pichugina^{1*}, L. V. Tsyro¹, D. A. Afanasyev², S. A. Kiselev³, F. G. Unger¹ (¹ National Research Tomsk State University, 36 Lenin Prosp., Tomsk, 634050, Russia; e-mail: alina.com9@mail.ru; ² Research Organization “Sibur-Tomskneftechim”, Tomsk, Russia; ³ OJS “TomskNIPIneft”, Tomsk, Russia)

стояниях. На сегодняшний день проведено много исследований ЖЧК различными физико-химическими методами, такими как рентгенофазовый анализ (РФА) [5], ИК спектроскопия [6], растровая электронная микроскопия (РЭМ) [7]. Эти спектроскопические методы позволяют определить в ЖЧК холестерин, соли кальция и магния и наличие следов различных пигментов. Как известно [8], пигментная часть ЖЧК содержит преимущественно билирубин, который данными методами определить трудно. В связи с этим актуально применение таких методов, как ядерный магнитный резонанс (ЯМР) [9] и электронный парамагнитный резонанс (ЭПР). Проблемы исследования ЖЧК накладывают отпечаток на познание их природы — условия их образования, существования и разрушения. Все известные сведения по этому вопросу периодически пересматриваются, тем не менее до сих пор остаются дискуссионными, что обусловлено, с одной стороны, сложностью природы ЖЧК, с другой — трудностями их анализа и интерпретации результатов.

Цель настоящей работы — выявление особенностей, связанных с уже сформированным ЖЧК, методами ЭПР и ^1H ЯМР. Как известно, метод ЭПР позволяет регистрировать свободные радикалы и любые молекулы, атомы, содержащие одну или несколько незамкнутых спин-орбиталей, а метод ^1H ЯМР — структуру органической части ЖЧК.

Эксперимент. Изучены холестериновые камни пациентов больниц Томской области. ЭПР-спектры образцов получены на спектрометре JEOL JES-FA200 ($T = 298$ К, частота СВЧ излучения ~ 9.4 ГГц, частота модуляции 100 кГц, чувствительность $7 \cdot 10^9$ спин/0.1 мТл, максимальная развертка магнитного поля 500 мТл, ширина модуляции 1 мТл, время развертки поля 4 мин). Для анализа использована кварцевая ампула с внутренним диаметром 3 мм, в нее засыпался измельченный образец. Количество спиновых центров (СЦ) в образце рассчитано по формуле

$$C_{\text{СЦ}} = (C_{\text{СЦ}}^*/m)(S_{\text{СЦ}}/S_{\text{СЦ}}^*),$$

где $C_{\text{СЦ}}^*$ — количество СЦ в эталоне; $S_{\text{СЦ}}$ и $S_{\text{СЦ}}^*$ — площадь под интегральной кривой для образца и эталона в пределах поля 150—450 мТл; m — масса образца, г. Эталонном являлась сажа, полученная из сахарозы путем нагревания до 650 °С в инертной атмосфере.

Спектры ЯМР получены на спектрометре Bruker Avance III 400 МГц ($T = 298$ К). Для приготовления раствора образец массой 10 мг растворяли в 500 мкл дейтерохлороформа. Химические сдвиги определялись относительно эталонного вещества тетраметилсилана (ТМС). Для записи спектра выполнено четыре сканирования, ширина развертки поля 10 м.д. РФА предварительно измельченных образцов проведен на рентгеновском дифрактометре XRD-7000S (Shimadzu, Япония), в котором используется рентгеновская трубка с медным анодом (CuK_α , $\lambda = 1.5418$ Å). Качественный фазовый анализ осуществлялся с использованием базы данных PDF-2, а количественный фазовый анализ и оценка степени кристалличности — с помощью программного обеспечения Shimadzu.

Результаты и их обсуждение. Свободным радикалом в ЖЧК может быть радикал билирубина, на что указывают многие работы по изучению билирубина, желчи, ЖЧК [10—12], хотя в [13] этот сигнал интерпретирован как резонанс, соответствующий низкоспиновому железу(III). Марганец может замещать Са и Mg в кристаллической решетке, который соосаждается с кальцием в карбонате кальция. Соосаждение может происходить несколькими способами: поверхностной адсорбцией, окклюзией, образованием следов дискретной фазы, образованием твердых растворов MnCO_3 в CaCO_3 [14]. При этом характер ЭПР-сигнала различный для разных систем карбоната кальция, содержащего примесь двухвалентного марганца, вследствие диполь-дипольных взаимодействий и спинового обмена близко находящихся двух СЦ марганца [15]. Двухвалентная медь наряду с двухвалентными марганцем, магнием, кальцием и железом может образовывать тетрапиррольные комплексы с билирубином, в которых металл окружен четырьмя атомами азота. Вероятно, комплексы меди с билирубином и производными билирубина отвечают за черную окраску пигментной части ЖЧК. Медь и железо распределены по ЖЧК равномерно, но участки с высоким содержанием меди соответствуют участкам содержания неорганических соединений серы, фосфора и кальция.

На рис. 1 представлены ЭПР-спектры ЖЧК. Вообще говоря, форма полученных спектров сложная и выделение отдельных участков носит условный характер. Форма широких линий отвечает гауссову распределению. Идентифицировать радикалы по наблюдаемым спектрам не всегда легко, тем не менее сравнение ЭПР-спектров позволяет выделить некоторые общие черты. В спектрах присутствуют: широкая линия с g -фактором ~ 4.2 , которая соответствует центру высокоспинового железа; узкая линия с $g \sim 2.0$, которая относится к свободным радикалам; широкая неразрешенная линия с $g \sim 2.5$ — 2.1 , связанная с наличием СЦ меди и марганца в фазе родохрозита. ЭПР-спектры различа-

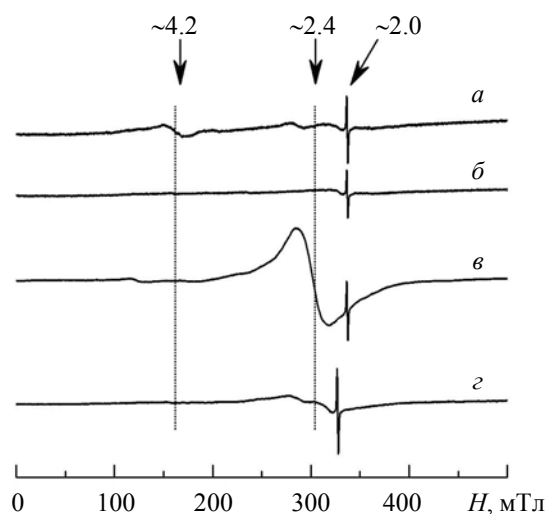


Рис. 1. ЭПР-спектры желчных камней Ж1 (а), Ж3 (б), Ж2 (в), Ж5 (г)

ются главным образом интенсивностью сигналов, что указывает на разное количество СЦ, а также шириной и положением пиков, что может быть объяснено различиями в окружении СЦ. Это подтверждается данными табл. 1.

Ранее указывалось [16—18], что ЯМР-спектр парамагнетиков на обычном оборудовании не наблюдается. Если спектр таких продуктов регистрируется, то он не может характеризовать исследуемое вещество целиком. Если молекула имеет ядро, которое в силу гомолитических процессов или реакций комплексообразования находится периодически в диамагнитной и парамагнитной частицах, то скорость релаксации складывается из двух составляющих: парамагнитной и диамагнитной. ЯМР молекул, периодически находящихся в области действия неспаренного электрона, дает уширенные и сдвинутые линии, что относится как к обратимым комплексам диа- и парамагнитных молекул, так и к диа- и парамагнитным молекулам в гомолитических обратимых процессах. Это молекулы, непосредственно контактирующие с парамагнетиками и образующие вокруг них оболочки [19].

Т а б л и ц а 1. Данные (C , спин/г, и g) ЭПР-исследования желчных камней

Образец	$C_{\text{общ}}, 10^{-19}$	~114—198 мТл, ~91—154 мТл		~269—304 мТл		~336 мТл	
		g	$C, 10^{-16}$	g	$C, 10^{-16}$	g	$C, 10^{-15}$
Ж1	1.9	4.1890	25.0	2.3659	3.12	2.0043	4.5
Ж3	2.6	—	—	—	—	2.0043	10.0
Ж2	11.8	5.6145	69.0	2.2349	—	2.0042	36.2
Ж5	0.5	—	—	—	—	2.0040	15.8

В [20] показано, что пигментная часть характеризуется большим количеством СЦ, чем холестерин. Этот факт накладывает отпечаток на ^1H ЯМР-спектр изученных ЖЧК, который характеризует диамагнитную составляющую. Обращает на себя внимание практическая однотипность ^1H ЯМР-спектров ЖЧК, приведенных на рис. 2, что свидетельствует об общности процессов образования и растворения данных камней в дейтерохлороформе.

Анализ спектров свидетельствует о наличии структуры холестерина ($\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}$), показанной на рис. 3. Согласно РФА, фазовый состав образцов Ж1—Ж5 — десмоesterol ($\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}$) 55 % и холестерин 55 %, степень кристалличности 46 %. С учетом этих данных, а именно наличия фазы десмоesteroла, проведено моделирование ^1H ЯМР-спектра последнего. Известно, что десмоesterol (рис. 4) — молекула, которая предшествует образованию холестерина. Сопоставление химических сдвигов для структуры десмоesteroла с ^1H ЯМР-спектрами ЖЧК (рис. 2) свидетельствует о его отсутствии, так как несколько линий (в частности, 5.2 м.д.) не наблюдаются в спектре. Это указывает на переход десмоesteroла в другую структуру, строение которой на данном этапе исследования предположить сложно. Согласно РФА, изученные ЖЧК характеризуются наличием примерно одинакового количества оди-

наковых фаз с одинаковой степенью кристалличности. Как и в случае ^1H ЯМР-спектров, получена характеристика холестериновой части ЖЧК, т. е. структур, которые образуют оболочки вокруг СЦ. Молекулы с открытыми спин-орбиталями являются аморфными образованиями с определенной долей кристаллической фазы, которая не может быть оценена по полученным спектрам.

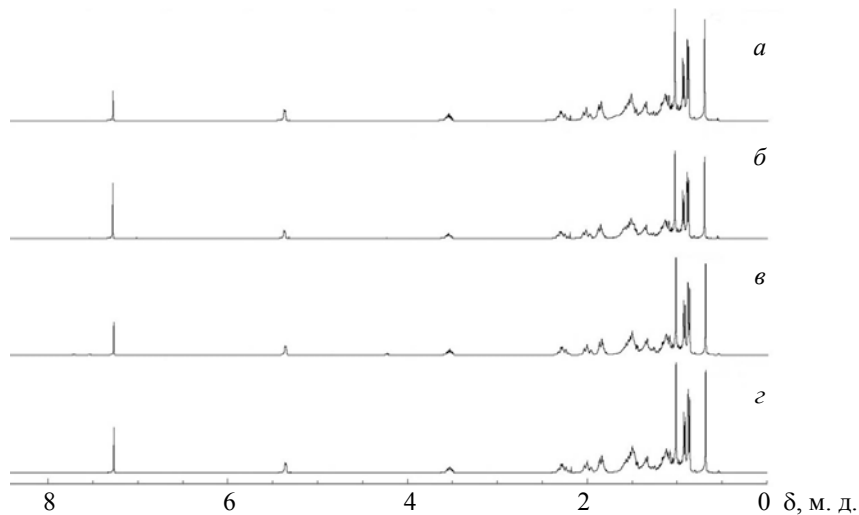


Рис. 2. ^1H ЯМР-спектры желчных камней Ж1 (*a*), Ж3 (*б*), Ж2 (*в*) и Ж5 (*г*) в дейтерохлороформе при 400 МГц

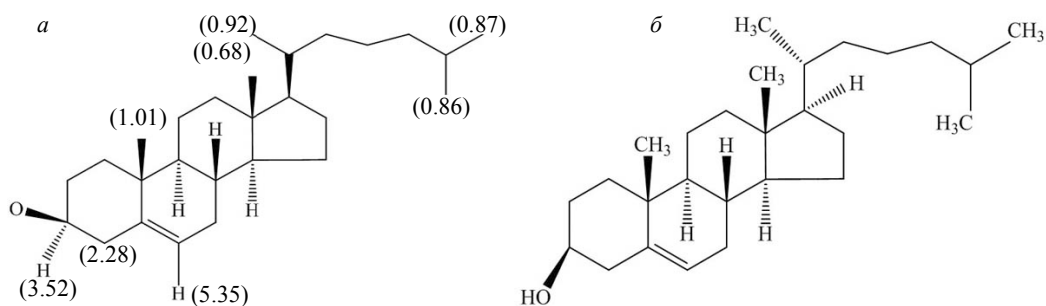


Рис. 3. Структура холестерина (в скобках указаны химические сдвиги, м.д.) согласно [21] (*a*) и [22] (*б*)

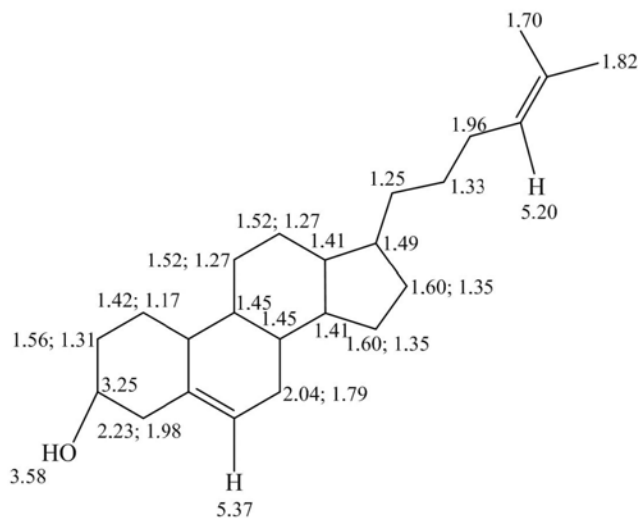


Рис. 4. Структура десмостерола

Организация структуры коллоидной частицы в гомолитах предусматривает локализацию в ее центре такой молекулы, которая своим силовым воздействием упорядочивала бы окружающие молекулы определенным образом. Полученные ^1H ЯМР-спектры и данные РФА свидетельствуют о наличии таких структур, а именно холестерина.

Заключение. Спиновые свойства желчных камней должны играть значительную роль при их исследовании. Если в системе идут гомолитические процессы, то концентрация спиновых центров должна непременно изменяться в зависимости от условий, в которых происходит формирование желчного камня. От этого зависят толщина слоев и размер камня. Валовый анализ желчных камней методом рентгенофазового анализа позволяет установить фазы, которые преобладают и имеют кристаллическую структуру. В то же время без предварительного разделения желчного камня на органическую и неорганическую составляющие (причем это деление достаточно условное) не удастся обнаружить соли кальция и магния, а также наличие следов пигментов. Метод ^1H ЯМР-спектроскопии дает представление о структуре диамагнитной составляющей желчного камня. Особенности, выявленные с помощью применяемых в работе методов, должны быть учтены при обсуждении механизма формирования желчных камней.

Работа выполнена в рамках государственного задания (№ гос. рег. 114051370021) Министерства образования и науки РФ (проект № 1432).

- [1] L. Amigo, V. Quipones, P. Mardones, S. Zanzungo, J. F. Miquel, F. Nervi, A. Rigotti. *Gastroenterology*, **118** (2000) 772—779
- [2] S. G. Corradini, W. Elisei, L. Giovannelli, C. Ripani, P. D. Guardia, A. Corsi, A. Cantafora, L. Capocaccia, V. Ziparo, V. Stipa, P. Chirletti, R. Caronna, D. Lomanto, A. F. Attili. *Gastroenterology*, **118** (2000) 912—920
- [3] A. D. Cooper. *Gastroenterol. Clin. North. Am.*, **20**, N 1 (1991) 21—46
- [4] R. K. Tandon. *Ann. Natl. Acad. Med. Sci. (India)*, **25** (1989) 213—222
- [5] E. Nikitina, G. Kuzmicheva, S. Orlova, Yu. Efimova. *Acta Crystal. A*, **60** (2004) 229
- [6] N. A. Channa, F. D. Khand, T. U. Khand, M. H. Leghary, A. N. Memons. *Pak. J. Med. Sci.*, **23** (2007) 546—550
- [7] T. Ogata, Y. Nishie. *Tohoku J. Exp. Med.*, **113** (1974) 371—381
- [8] Y. Sun, Z. Yang, G. Chen, Y. Zhou, X. Zhou, J. Wu, G. Xu. *Sci. China. Ser. S.B*, **44**, N 5 (2001) 449—456
- [9] Nagana Gowda, O. B. Ijare, B. S. Somashekar, A. Sharma, V. K. Kapoor, C. L. Khetropal. *Lipids*, **41**, N 6 (2006) 591—603
- [10] G. Elek, A. Rockenbauer. *Klin. Wochenshr.*, **60** (1982) 33—35
- [11] X.-T. Liu, J. Xu. *World J. Gastroenterol.*, **8**, N 3 (2002) 413—417
- [12] E. Chikvaidze, T. Tabutsadze, T. Gogoladze, G. Datuashvili, B. Iremashvili. *Georgian Med. News*, **168**, N 3 (2009) 11—15
- [13] M. Polakovs, N. Mironova-Ulmane, A. Pavlenko, E. Reinholds, M. Gavare, M. Grube. *Adv. Bio-med. Spectrosc.*, **7** (2013) 215—219
- [14] А. Иевиньш, Ф. Ошис, Э. Матеус. *Вестн. АН Латв. ССРС*, № 2 (91) (1995) 87—100
- [15] С. С. Бердоносков, Д. Г. Бердоносова, И. В. Знаменская. *Хим. технол.*, № 8 (2002) 2—11
- [16] Р. Драго. *Физические методы в химии*, пер. с англ., **1**, Москва, Мир (1981)
- [17] Я. Рабек. *Экспериментальные методы в химии полимеров*, **1**, пер. с англ., Москва, Мир (1983)
- [18] Ф. Г. Унгер. *Проблемы химии нефти*, Новосибирск, Наука (1992) 114—120
- [19] Ф. Г. Унгер, Л. Н. Андреева. *Фундаментальные аспекты химии нефти. Природа смол и асфальтенов*, Новосибирск, Наука (1995)
- [20] С. А. Киселев, Л. В. Цыро, Д. А. Афанасьев, Ф. Г. Унгер, М. М. Соловьев. *Журн. прикл. спектр.*, **81**, № 1 (2014) 141—145 [S. A. Kiselev, L. V. Tsyro, D. A. Afanasiev, F. G. Unger, M. M. Soloviev. *J. Appl. Spectr.*, **81**, N 1 (2014) 140—144]
- [21] SDBS [Электронный ресурс]; http://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/direct_frame_top.cgi; дата обращения: 01.04.2016
- [22] ChemSpider Search and share chemistry [Электронный ресурс]; <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.5775.html?rid=23f55ca4-be89-448f-9eef-a964ea4c892e>; дата обращения: 01.04.2016