

**М.В. Кручинина, С.А. Курилович, М.В. Паруликова,
А.А. Громов, М.М. Шакиров**

³¹P ЯМР-СПЕКТРОСКОПИЯ ЭРИТРОЦИТОВ И ФИБРОЗ ПЕЧЕНИ: ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

ГУ НИИ терапии СО РАМН, Новосибирск.
Институт органической химии СО РАН, Новосибирск.

В исследование включено 19 мужчин в возрасте от 35 до 60 лет с различными стадиями диффузных заболеваний печени. Степень выраженности фиброза установлена гистологически. Пункционная биопсия печени выполнялась по клиническим показаниям с информированного согласия пациентов. Клинический диагноз устанавливался на основании комплекса клинических, инструментальных и морфологических методов исследования. По степени выраженности фиброза пациенты разделены на 2 группы: 1) пять пациентов с легким и умеренным фиброзом (F1 и F2); 2) четырнадцать пациентов с тяжелым фиброзом и циррозом печени (F3 и F4). Группа сравнения (F0) представлена 33 условно здоровыми мужчинами. Выявлены существенные различия компонентов фосфорных ЯМР-спектров эритроцитов у больных с диффузной патологией печени: по мере увеличения степени фиброза отмечено повышение интенсивности пиков, отражающих резонансы глюкозо-6-фосфатов, АМФ, ИМФ, пирофосфатов, 2,3-ДФГ и понижение пиков, представляющих резонансы неорганических фосфатов и фосфокреатина, γ -, α - и β -АТФ, УТФ, Нв- и Mg-АТФ, а также β - и α -АДФ. Предсказательная ценность положительного результата ³¹P ЯМР-спектроскопии эритроцитов в отношении фиброза печени составляет 92,3% при достаточно высокой чувствительности и специфичности.

Ключевые слова: ³¹P ЯМР-спектроскопия, эритроцит, фиброз, диффузные заболевания печени

Введение

Современной гепатологии известно множество этиологических факторов (вирусы гепатитов, алкоголь, аутоиммунные реакции, генетически обусловленные метаболические нарушения), воздействие которых приводит к развитию хронических диффузных заболеваний печени.

Несмотря на разнообразие патогенетических механизмов воздействия на печень, развитие и хронизация процессов ее повреждения сопровождаются системными, во многом однотипными, эволюционно устоявшимися, однонаправленными структурными изменениями ткани органа — активацией процессов фиброгенеза. Степень фиброза и скорость его прогрессирования определяют прогноз болезни и выбор терапии. Характеристика стадии болезни в гепатологическом диагнозе является обязательным компонентом после этиологии и активности.

По степени выраженности фиброз принято делить на 4 стадии [1]. Первая характеризуется фиброзом нескольких портальных трактов, не выходящим за их пределы. Вторая стадия — фиброз большинства портальных трактов с редкими перипортальными септами и единичными порто-

портальными тяжами. Эти две стадии характеризуют легкий и умеренный фиброз печени. При третьей стадии фиброза наблюдаются множество септ и фиброзных мостиков, но без нарушения дольковой структуры печени. Четвертая стадия характеризуется формированием ложных (псевдо) долек и является цирротической.

Золотым стандартом оценки степени фиброза печени (стадии заболевания) является морфологический (гистологический) метод, инвазивный, требующий пункционной биопсии печени.

В клинической практике широко применяется полуколичественная оценка фиброза (METAVIR, Knodell, Ishak [2, 3]). Целью оценки является получение суммарного клинически значимого показателя, отражающего все морфологические признаки (локализацию, распространенность, выраженность) повреждения ткани печени. Основным неудобством при работе с этими системами является то, что нет четкого разграничения критериев оценки фиброза печени, с одной стороны, и показателей, оценки выраженности некро-воспалительной реакции (индекс гистологической активности — ИГА) — с другой, что приводит к неоднозначной трактовке полученных результатов.

Другая группа методов оценки фиброза печени — это современные макроморфологические методы визуализации (УЗИ, КТ, ЯМРТ). Отсутствие четких критериев оценки фиброза на ранних этапах его развития не позволяет использовать эту группу методов на доцирротической стадии заболевания.

В последние годы в диагностике фиброза печени все чаще начинают использоваться биохимические методы, основанные на изучении активности ферментов, принимающих участие в образовании и деградации внеклеточного комплекса [4]. Однако их использование затруднено в связи с высокой трудоемкостью и стоимостью методик.

Недостатками всех перечисленных методов являются высокая трудоемкость, необходимость применения широкой номенклатуры различных ингредиентов, субъективизм, иногда противодействие со стороны пациента и т.д. [1]. Поэтому поиск новых подходов и методов неинвазивной диагностики фиброза печени весьма актуален.

Эритроцит — биологическая субстанция, которая обеспечивает транспорт кислорода и участвует в поддержании гомеостаза в органах и тканях организма. В силу многочисленности эритроцитов основные физико-химические свойства крови определяются преимущественно этими клетками. Поскольку между расстройствами функций печени и гомеостазом крови существует тесная связь, то для широкой клинической практики ценным диагностическим критерием состояния печени, в том числе степени накопления фиброза, может стать оценка структурных характеристик эритроцитов.

Одним из современных перспективных методов, позволяющих детально изучить структуру мембран клеток, является ЯМР-спектроскопия [5, 6, 7]. Суть метода основана на явлении резонансного поглощения энергии высокочастотного электромагнитного поля ядрами атомов, имеющими не равный нулю магнитный момент. Результаты многих исследований свидетельствуют об исключительной информативности спектроскопии ЯМР в изучении состава, строения, структуры и свойств биологических систем, в частности для изучения динамической структуры мембран [5,7]. Наиболее важными ядрами при исследовании биологических объектов являются ³¹P, ¹H, ¹³C.

Основной гипотезой исследования являлось предположение о наличии особенностей ³¹P ЯМР-спектров эритроцитов при различной выраженности фиброза печени и возможности использования структурных характеристик эритроцитов

для его разграничения («легкий» — «тяжелый» фиброз).

Целью данной работы являлось исследование особенностей ³¹P ЯМР-спектров эритроцитов у пациентов с диффузными заболеваниями печени и оценка возможности использования этих показателей для дискриминирования степени выраженности фиброза.

Материалы и методы

Исследования проводились на взвесах эритроцитов. Для приготовления взвеси эритроцитов брали кровь из вены, стабилизировали ее 3,8% раствором цитрата натрия из расчета 1:9. Эритроциты отмывали от плазмы буферным раствором (рН = 7,36), содержащим 154 ммоль/л NaCl, 4,3 ммоль/л KCl при температуре 2-3 °C трехкратным центрифугированием при скорости центрифугирования: 1500-2000 об./мин. в течение 15 минут.

В исследование включено 19 пациентов (мужчины в возрасте от 35 до 60 лет) с диффузными заболеваниями печени (ДЗП), подписавших информированное согласие на участие в исследованиях. Группу сравнения составили 33 человека.

Степень выраженности фиброза печени в группе ДЗП установлена на основании данных биопсии печени, которая была проведена всем пациентам с диффузными заболеваниями печени. В группе сравнения биопсия печени не проводилась по этическим соображениям. Всем включенным в проект выполнены биохимические и инструментальные исследования, УЗИ печени, селезенки, а также портальных сосудов. Вирусная этиология заболевания устанавливалась на основании обнаружения серологических маркеров методом иммуноферментного анализа (ИФА) и (или) ДНК и РНК вирусов методом полимеразноцепной реакции (ПЦР), а алкогольная — при отрицательных результатах ИФА сывороточных маркеров вирусных гепатитов и достоверно подтвержденном систематическом употреблении алкоголя.

Пациенты с ДЗП разделены на две группы: с первой или второй стадиями фиброза (легкий и умеренный фиброз — F1-F2) — 5 человек и с третьей или четвертой стадиями фиброза (выраженный фиброз — F3-F4) — 14 человек. По уровню биохимической активности группы с различной степенью фиброза достоверно не различались, у большинства пациентов в обеих группах она соответствовала умеренной степени.

Фиброз печени в группе сравнения (условно здоровые мужчины, у которых при клиническом и инструментальном обследовании патологии печени и сердца не выявлено) принимался за нулевую стадию (F0).

³¹P ЯМР-спектры записывали на ЯМР-спектрометре DRX 500 фирмы Bruker (Германия) со следующими характеристиками: частота — 202,46 МГц; количество накоплений спектров — 1024; время задержки между накоплениями — 2 с; развертка — 80 м.д. Для накопления и обработки спектров использована программа XWIN-NMR, Version 3.1. Химические сдвиги отсчитывались от внутреннего стандарта — 2,3-ДФГ (хим. сдвиг: 3,3 м.д. для 3-Р и 2,6 м.д. для 2-Р). Высота пиков спектров оценивалась в процентном отношении к максимальному по высоте пику спектра. Ширина пиков измерялась в герцах (Гц). Интегральные интенсивности (площади резонансов) рассматривались как относительные величины (производные от площади реперного пика спектра, принятого за единицу площади).

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы SPSS v.10, достоверность различий показателей оценивали по критериям Стьюдента, хи-квадрат, по Пирсону; $p < 0,05$ считалось статистически значимым.

Результаты исследования

На *рисунке 1* представлен типичный ³¹P ЯМР-спектр взвеси эритроцитов с обозначением основных пиков.

Основными компонентами спектра являются сигналы при 3,8 м.д. (3-Р) и 3,02 м.д. (2-Р) 2,3-дифосфоглицерата. Заметными являются резонансы неорганических фосфатов P_i (2,65 м.д.) и резонансы монофосфатов (АМФ, ИМФ и др.) — 4,5-4,7 м.д.; пирогосфата (4,18 м.д.). Меньшей интенсивностью отличаются сигналы три- и дифосфатов: три резонанса АТФ (γ -АТФ, γ -УТФ при -5,6 м.д.; α -АТФ, α -УТФ при -10,06 м.д.; β -АТФ, β -УТФ при -19,6 м.д.); пиками микроокружения гамма-АТФ и α -АТФ являются резонансы гемоглобин-АТФ (-4,5 м.д.), β -АДФ, УДФ, ИДФ (-6,2 м.д.), α -АДФ, УДФ, ИДФ (-9,9 м.д.), Mg-АТФ (-10,7-11,0 м.д.). Кроме того, при -3,13

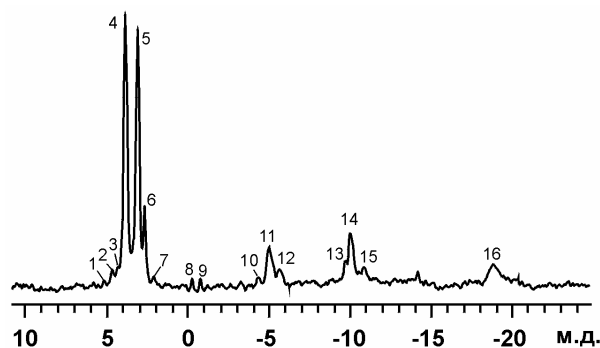


Рис. 1. Типичный ³¹P ЯМР-спектр взвесей эритроцитов: 202,46 МГц от 10 до -25 м.д. в K^+ - Na^+ -буфере, pH = 7,36 при 25 °C; (внутренний стандарт — 2,3 ДФГ (хим. сдвиги: 3,3 м.д. для 3-Р и 2,6 м.д. для 2-Р)

м.д. регистрируются незначительно выраженные пики фосфокреатина и при -14,1 м.д. — сигналы замещенных пирофосфатов. По мере увеличения времени хранения крови уровень 2,3-ДФГ падает, растет количество неорганических фосфатов и АМФ и, кроме того, соотношение интенсивностей сигналов α -, β - и γ -АТФ (УТФ) изменяется. Растет доля интенсивностей сигналов α -АТФ и β -АТФ и падает интенсивность сигнала γ -АТФ. Этот факт интерпретируется как распад АТФ и увеличивающийся вклад АДФ и АМФ.

Анализ ³¹P-ЯМР спектров взвесей эритроцитов у больных с диффузной патологией печени при различной степени выраженности фиброза позволил выявить преобладание величин пиков моно- и пирофосфатов у больных с выраженным фиброзом печени и большинства резонансов ди- и трифосфатов у больных с легким фиброзом (Таблица 1).

Количество монофосфатных пиков было больше у больных со степенью фиброза F3-F4 печени по сравнению с группой пациентов со степенью фиброза F1-F2 ($p < 0,02$). Высота и площадь резонансов глюкозо-6-фосфатов, АМФ, ИМФ, пирофосфатов, 2,3-ДФГ (пики 1, 2, 3, 4-5 на ³¹P-ЯМР спектрах взвесей эритроцитов) также оказались достоверно больше в группе со степенью фиброза печени F3-F4, причем площадь 2,3-ДФГ прямо коррелировала со степенью выраженности фиброза печени ($r = +0,423$, $p < 0,034$). Выявлены прямые корреляции интенсивностей пиков глюкозо-6-фосфатов, АМФ, пирофосфатов с уровнями непрямого билирубина ($r = +0,378$, $p < 0,012$; $r = +0,401$, $p < 0,027$; $r = +0,318$, $p < 0,042$, соответственно).

Высоты, площади резонансов неорганических фосфатов и фосфокреатина (пики 6, 7 на спектре), а также количество пиков, регистрирующихся после неорганических фосфатов, у больных со степенью фиброза F1-F2 достоверно превышали таковые у пациентов со степенью фиброза F3-F4 ($p < 0,01$ для высоты 6-го пика, $p < 0,02$ для высоты 7-го пика, $p < 0,02$ для количества пиков, следующих за неорганическими фосфатами), при этом обнаружилась прямая достоверная связь интенсивности пиков неорганических фосфатов со степенью биохимической активности гепатита ($r = +0,451$, $p < 0,05$).

Характеристики резонансов γ -, α - и β -АТФ (пики 12, 14 и 16), т.е. площади пиков оказались достоверно больше у больных со степенью фиброза F1-F2 по сравнению с пациентами со степенью фиброза F3-F4. Выявлены достоверные корреляции между степенью фиброза печени и высотой пиков γ -АТФ ($r = -0,478$, $p < 0,03$) и α -АТФ ($r = -0,352$, $p < 0,05$). Установлена отрицательная

Таблица 1

Характеристики резонансов ³¹P ЯМР-спектров взвесей эритроцитов у больных с разной степенью выраженности фиброза в печени ($M \pm m$)

Характеристики резонансов Группы больных	Количество монофосфат-пиков	Характеристики 1 пика		Характеристики 2 пика		Характеристики 3 пика	
		Высота, (%)	Ширина, (Гц)	Высота, (%)	Ширина, (Гц)	Высота, (%)	Ширина, (Гц)
1 группа (F1F2)	1,13±0,047	5,441±0,279	58,54±1,27	10,784±2,362	50,144±2,75	7,522±1,142	41,03±1,97
2 группа (F3F4)	1,64±0,21	7,682±0,678	63,98±1,54	19,521±2,181	57,69±2,32	10,443±1,031	44,78±2,14
p<	0,02	0,003	0,01	0,01	0,05	0,053	0,1

продолжение

Характеристики резонансов Группы больных	Характеристики 45 пиков			Характеристики 6 пика		Колво пиков постнеорг. фосфора
	Высота 4 пика, (%)	Высота 5 пика, (%)	Ширина (Гц)	Высота, (%)	Ширина, (Гц)	
1 группа (F1F2)	98,165±0,267	93,01±0,652	92,14±1,34	95,119±0,863	84,22±1,03	1,42±0,064
2 группа (F3F4)	99,987±0,278	96,74±0,787	97,89±2,36	91,687±0,791	78,41±2,32	1,23±0,047
p<	0,0001	0,001	0,05	0,01	0,05	0,02

продолжение

Характеристики резонансов Группы больных	Характеристики 7 пика		Характеристики 10 пика		Характеристики 11 пика	
	Высота, (%)	Ширина, (Гц)	Высота, (%)	Ширина, (Гц)	Высота, (%)	Ширина, (Гц)
1 группа (F1F2)	24,124±1,321	40,98±1,12	3,971±0,224	50,47±2,07	14,147±0,484	120,65±2,47
2 группа (F3F4)	19,011±1,681	36,17±1,35	2,870±0,396	41,24±2,11	8,689±0,735	106,32±3,01
p<	0,02	0,01	0,02	0,002	0,0001	0,001

продолжение

Характеристики резонансов Группы больных	Характеристики 12 пика		Характеристики пика плато пост γАТФ		Характеристики 13 пика	
	Высота, (%)	Ширина, (Гц)	Высота, (%)	Ширина, (Гц)	Высота, (%)	Ширина, (Гц)
1 группа (F1F2)	4,891±0,187	79,89±2,36	3,057±0,261	158,36±3,16	5,658±0,387	43,58±2,96
2 группа (F3F4)	3,074±0,265	71,32±3,05	2,112±0,364	149,21±2,42	3,921±0,374	39,25±3,07
p<	0,0001	0,05	0,05	0,05	0,002	0,1

продолжение

Характеристики резонансов Группы больных	Характеристики 14 пика		Характеристики 15 пика		Высота плато αАТФ (%)	Характеристики 16 пика	
	Высота, (%)	Ширина, (Гц)	Высота, (%)	Ширина, (Гц)		Высота, (%)	Ширина, (Гц)
1 группа (F1F2)	17,821±0,641	124,68±2,98	4,924±0,197	70,25±2,18	4,391±0,128	5,287±0,107	356,54±3,11
2 группа (F3F4)	10,157±0,819	116,35±3,12	3,981±0,147	62,04±3,07	4,342±0,231	3,174±0,124	304,32±4,25
p<	0,0001	0,05	0,001	0,05	0,1	0,0001	0,0001

корреляция выраженности пиков γ-, α- и β-АТФ с уровнем сывороточного железа ($r=-0,375$, $p<0,034$ для γ-АТФ; $r=-0,269$, $p<0,04$ для α-АТФ; $r=-0,498$, $p<0,053$ для β-АТФ) в группе пациентов со степенью фиброза F3-F4.

Следует отметить, что большее по площади пост-γ-АТФ-плато регистрировалось у 11,23% пациентов с невыраженным фиброзом (F1-F2) и у 29,36% больных с выраженным фиброзом печени (F3-F4). Та же тенденция прослеживалась в отношении пост-α-АТФ-плато, которое зафиксировано у 16,2% больных со степенью фиброза F1-F2 и 37,24% больных со степенью фиброза F3-F4.

Высоты и площади резонансов α- и гамма-УТФ, Нв- и Mg-АТФ, а также β- и α-АДФ были

достоверно выше у больных первой группы (F1-F2) по сравнению со второй группой (F3-F4). Интересно, что частота регистрации резонансов γ-УТФ, Нв-АТФ (пик 10) и α-АДФ (пик 13) была существенно выше у больных со степенью фиброза F1-F2 — в 64,72% случаев против 27,54% случаев в группе пациентов с F3-F4 (для 10 пика) и в 59,32% против 31,63% (для 13 пика).

Анализ полученных данных позволил выделить дискриминирующие значения характеристик резонансов ³¹P ЯМР-спектров эритроцитов для пациентов с различными стадиями фиброза (Таблица 2). Наиболее важными дискриминирующими показателями степени фиброза печени являются характеристики резонансов: глюкозо-6-фосфата, 2,3-ДФГ, γ-, α-, β-АТФ, -УТФ, Mg-АТФ,

Таблица 2

Характеристики резонансов ³¹P ЯМР-спектров взвесей эритроцитов у больных с разной степенью выраженности фиброза в печени (дискриминирующие значения)

Характеристики резонансов Группы больных	Количество монофосфат-пиков	Высота 1-го пика, (%)	Характеристики 3 пика		Характеристики 4-5 пиков		
			Высота, (%)	Ширина, (Гц)	Высота 4 пика, (%)	Высота 5 пика, (%)	Ширина (Гц)
Группа сравнения (F0)	0,742 - 0,855	4,391-4,818			98,760-98,948	-	70,368-89,064
1 группа (F1-F2)	—	4,819-5,146	4,975-6,587	36,637-36,777	97,57-98,465	91,556-91,869	91,152-95,128
2 группа (F3-F4)	1,64–2,425	7,755-10,218	10,069-14,299	49,816-52,784	100,98-101,03	97,231-99,683	102,51-106,72

продолжение

Характеристики резонансов Группы больных	Высота 6 пика (%)	Высота 7 пика (%)	Высота 10 пика (%)	Характеристики 11 пика		Характеристики 12 пика	
				Высота, (%)	Ширина, (Гц)	Высота, (%)	Ширина, (Гц)
Группа сравнения (F0)	-	-	4,473-7,157	15,226-19,723	126,16-146,91	5,308-6,169	85,153-111,21
1 группа (F1-F2)	96,829-97,043	25,298-27,069	-	12,927-13,068	115,14-117,87	4,474-5,307	74,627-85,153
2 группа (F3-F4)	88,729-92,455	12,724-19,491	1,389-2,473	5,94-11,438	95,063-117,58	2,083-3,506	59,913-74,626

продолжение

Характеристики резонансов Группы больных	Характеристики пика плато пост γ-АТФ		Ширина 13 пика, (Гц)	Характеристики 14 пика		Характеристики 15 пика	
	Высота, (%)	Ширина, (Гц)		Высота, (%)	Ширина, (Гц)	Высота, (%)	Ширина, (Гц)
Группа сравнения (F0)			50,732-73,131	19,25-24,765	131,33-177,23	5,363-5,966	75,111-111,53
1 группа (F1-F2)	3,473-3,639	158,26-165,41	36,978-50,181	16,392-19,240	118,03-131,33	4,485-5,362	65,389-74,99
2 группа (F3-F4)	0,751-2,475	140,16-151,31	27,768-36,979	7,094-13,22	104,68-118,02	3,431-4,354	50,558-51,49

продолжение

Характеристики резонансов Группы больных	Высота плато α-АТФ (%)	Высота 16 пика (%)
Группа сравнения (F0)	5,206-7,079	5,526-7,485
1 группа (F1-F2)	4,151-4,676	5,048-5,520
2 группа (F3-F4)	3,478-4,106	2,71-3,638

Таблица 3

Результаты оценки метода ЯМР-спектроскопии эритроцитов для выявления степени фиброза печени по сравнению с данными биопсии печени

Результаты ЯМР спектроскопии эритроцитов	Результаты биопсии печени	
	Группа F3-F4 n = 14 случаев	Группа F1-F2 n = 5 случаев
Группа F3-F4 n = 13 случаев	Истинно положительный Группа F3-F4 n = 12	Ложно положительный Группа F1-F2 n = 1
Группа F1-F2 n = 6 случаев	Ложно отрицательный Группа F3-F4 n = 2	Истинно легкий фиброз Группа F1-F2 n = 4

Чувствительность $12 : (12 + 2) \times 100\% = 85,71\%$;Специфичность $4 : (1 + 4) \times 100\% = 80\%$;Прогностическая ценность «+» результата метода $12 : (12 + 1) \times 100\% = 92,31\%$;Прогностическая ценность «-» результата метода $4 : (2 + 4) \times 100\% = 66,67\%$;Индекс точности $(12 + 4) / (12 + 1 + 2 + 4) \times 100\% = 84,21\%$

β- и α-АДФ, УДФ, плато α-АТФ. Для выделения легкого, невыраженного фиброза (F1-F2) от выраженной стадии (F3-F4) возможно также использование параметров пиков пиридоксальфосфатов, неорганических фосфатов, фосфокреатина и «плато» пост γ-АТФ.

Результаты оценки метода ЯМР-спектроскопии эритроцитов для выявления стадии фиброза печени по сравнению с данными биопсии печени («золотого стандарта» для оценки стадии фиброза) представлены в таблице 3, они демонстрируют достаточно высокие значения чувствительности (85,71%) и специфичности (80%), а также прогностическую ценность «+» результата (92,31%).

Обсуждение

Ранее проведенные исследования отечественных и зарубежных авторов [1, 8-11] подтверждают высказывание, что эритроцит, в частности его мембрана, являются своеобразным «зеркалом», отражающим состояние клеток других тканей и

систем, в том числе и печени. Это положение становится весьма привлекательным в свете поиска новых неинвазивных методов и подходов в диагностике различных стадий фиброза, поскольку именно стадия фиброза печени во многом определяет как прогноз для данного больного, так и характер проводимой терапии. Не менее важной является возможность наблюдения за процессом в динамике, поскольку это позволяет изменить тактику лечения. Использование метода ЯМР-спектроскопии эритроцитов, который доказал свою исключительную точность и информативность в изучении состава, динамической структуры мембран, в целях определения стадии фиброза печени с возможностью выявления ранних стадий процесса, по нашему мнению, является вполне оправданным. Представляется целесообразным обсуждение ряда данных, полученных в нашей работе.

Сравнение параметров резонансов ³¹P ЯМР-спектров эритроцитов у больных с диффузной патологией печени и лиц группы сравнения позволило выявить существенные различия во всех областях спектра, что свидетельствует о значительных сдвигах в уровне и составе фосфоросодержащих соединений при развитии патологического процесса в печени.

Наблюдаемые в нашей работе снижение уровня три- и дифосфатов и высокий уровень 2,3-дифосфоглицериновой кислоты в группе больных с выраженным фиброзом, вероятно, отражают значительный уровень гипоксии в этой группе пациентов. Известно, что главная функция 2,3-ДФГ состоит в регуляции сродства гемоглобина к кислороду и, следовательно, оксигенация клеток крови влияет на связывание фосфорных метаболитов с оксигемоглобином и может вызвать его полимеризацию. Это может существенно изменить величины химических сдвигов ³¹P и форму линий сигналов ³¹P-содержащих метаболитов, особенно 2,3-ДФГ и АТФ.

Кислородтранспортная функция эритроцитов зависит не только от количества и свойств содержащегося в них гемоглобина, но и от условий функционирования последнего. При этом одной из наиболее распространенных адаптивных реакций к изменившимся потребностям организма в кислороде является изменение функциональных свойств гемоглобина. Было установлено, что 2,3-ДФГ, образуя специфические комплексы с гемоглобином, заметно изменяет сродство гемоглобина к кислороду. При недостатке кислорода в среде концентрация 2,3-ДФГ в эритроцитах возрастает, вследствие чего сродство гемоглобина к кислороду снижается, кривая диссоциации оксигемоглобина смещается вправо, происходит увеличение

поступления кислорода к тканям. Аналогичные изменения содержания 2,3-ДФГ описаны и при различных видах малокровия [7,12], что согласуется с представлением об адаптационном характере повышения уровня образования 2,3-ДФГ для облегчения транспорта кислорода.

Одним из условий нормальной жизнедеятельности эритроцита является поддержание внутриклеточного уровня АТФ — стабилизация концентрации АТФ (Atkinson, 1968). Единственной АТФ-производящей системой в эритроцитах человека является анаэробный гликолиз, включающий основной путь Эмбдена-Мейергофа (ПЭМ), пентозофосфатный путь (ПП) и 2,3-дифосфоглицератный шунт (ДФГШ). Особенностью гликолиза эритроцитов человека является то, что концентрация 2,3-ДФГ крайне медленно (около 10 часов) релаксирует к новому стационарному уровню при изменении условий (Rapoport et al., 1976). При этом происходит стабилизация уровня АТФ за счет нестационарных процессов в ДФГШ. В эксперименте по истечении 10-12 часов происходит падение концентрации АТФ, что связывают с истощением запасов 2,3-ДФГ — резервуара для производства АТФ. Эти данные проливают свет на биологическую роль 2,3-ДФГ и ДФГШ в эритроцитах человека. Дополнительная стабилизация уровня АТФ за счет ДФГШ может оказаться очень важной в условиях окислительного стресса, когда часть гликолитического потока ответвляется в пентозофосфатный путь. Этот механизм регуляции позволяет сформулировать следующий принцип: наличие в системе медленного релаксационного процесса способно существенно улучшить характеристики регуляции уровня ключевых соединений. Такая нестационарная регуляция способна защитить клетку от воздействий, продолжительность которых не слишком велика. Однако при изменении концентрации АТФ в регуляторной области в течение длительного времени стационарные потоки в ДФГШ меняются незначительно в силу особенностей кинетики ДФГШ-реакции, и учет этих потоков не изменяет сколько-нибудь заметно качество стабилизации АТФ [7, 12]. Таким образом, в условиях длительной гипоксии при нарастании выраженности фиброза наблюдаются своеобразные «ножницы» между уровнем возросшего 2,3-ДФГ и сниженной концентрацией всех видов трифосфатов, что, вероятно, отражает следующий уровень адаптационных механизмов.

Истощение АТФ в эритроцитах приводит к ряду нарушений, в том числе к блокированию ионных насосов и изменению ионного баланса в системе среда-клетка. Это способствует снижению соотношения площади поверхности к объ-

ему эритроцитов и превращению клеток в труднодеформируемые сферы. Что, в свою очередь, затрудняет транспорт кислорода из эритроцита тканям и усугубляет гипоксию, которая стимулирует фиброзообразование.

С другой стороны, при прогрессировании фиброза отмечается усиление перекисного окисления липидов [11, 13], что существенно снижает уровень восстановленного глутатиона, который расходуется для разложения гидроперекисей липидов и H_2O_2 . S. Rapoport и D. Schleuch (1960) убедительно показали, что снижение уровня восстановленного глутатиона в эритроцитах приводит к инактивации ряда ключевых ферментов (глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, пироглутаматаза, гексокиназа). Это сопровождается увеличением уровня монофосфатов, пироглутамата и глюкозо-6-фосфата, которые являются субстратами для указанных ферментов, что и наблюдается в группе пациентов со степенью фиброза F3-F4. Подобные изменения в эритроцитах вызывают их преждевременную гибель, т.е. лизис клеток с высвобождением гемоглобина и нарастанием уровня непрямого билирубина, чем и объясняются тесные корреляции последнего с уровнями моно-, пиро- и глюкозо-6-фосфатов.

Весьма интересной с точки зрения факторов, которые могут влиять на скорость прогрессирования фиброза, является выявленная в нашей работе обратная взаимосвязь выраженности основных пиков трифосфатов (гамма-, альфа- и бета — АТФ) и уровня сывороточного железа. Дело в том, что в проведенных ранее исследованиях [1, 14, 15] установлена связь степени развития фиброза с повышенным накоплением железа в ткани печени. Ускоренное развитие фиброза в условиях перегрузки железом можно объяснить тем, что при этом имеет место активизация процессов перекисного окисления, продукты которого могут оказывать профиброгенное влияние. Высокий уровень железа сыворотки крови оказывает значительное парамагнитное воздействие и приводит к существенному снижению, «размыванию» пиков ЯМР-спектров эритроцитов. С другой стороны, перегрузка железом усиливает прогрессирование фиброза, что, в свою очередь, способствует и усугубляет дефицит макроэргических соединений.

Более частая регистрация сглаженных пиков микроокружения (плато пост- γ -, α -АТФ) на спектрах эритроцитов у пациентов со степенью фиброза F3-F4, возможно, также является отражением усиления процессов перекисного окисления в клетках, что неизбежно в условиях длительно существующей гипоксии и, следовательно, накопления недоокисленных продуктов обмена. Аналогичные изменения происходят в мембранах гепатоцитов

в случаях умеренного и явного поражения печени [1, 4, 15, 16]. У таких пациентов, как правило, большая длительность и тяжесть течения заболевания, поэтому синтез фракций эритроцитов с подобными измененными свойствами мембран может рассматриваться как адаптивная реакция организма на процесс прогрессирования фиброза.

Выводы

1. Фосфорные ЯМР-спектры эритроцитов существенно различаются по уровню и составу фосфоросодержащих метаболитов эритроцитов у больных с диффузной патологией печени при различной степени фиброза: по мере увеличения степени фиброза отмечено повышение интенсивности пиков, отражающих резонансы глюкозо-6-фосфатов, АМФ, ИМФ, пироглутамата, 2,3-ДФГ и понижение пиков, представляющих резонансы неорганических фосфатов и фосфокреатина, γ -, α - и β -АТФ, УТФ, Нв- и Mg-АТФ, а также β - и α -АДФ. При выраженной степени фиброза (F3-F4) чаще регистрируются пост- γ -АТФ-плато и пост- α -АТФ-плато.

2. Выявлены достоверные корреляционные связи между компонентами ³¹P ЯМР-спектров и основными показателями, отражающими биохимическую активность гепатита, а в группе больных со степенью фиброза F3-F4 — с уровнями сывороточного железа.

3. Предсказательная ценность положительного результата ³¹P ЯМР-спектроскопии эритроцитов в отношении фиброза печени составляет 92,3% при достаточно высокой чувствительности и специфичности.

4. Наиболее важными дискриминирующими показателями степени фиброза печени являются характеристики резонансов: глюкозо-6-фосфата, 2,3-ДФГ, γ -, α -, β -АТФ, УТФ, Mg-АТФ, β - и α -АДФ, УДФ, плато α -АТФ.

³¹P NMR SPECTROSCOPY OF ERYTHROCYTES AND LIVER FIBROSIS: PILOT INVESTIGATION

M.V. Kruchinina, S.A. Kurilovich, M.V. Parulikova, A.A. Gromov, M.M. Shakirov,

Under supervision there were 19 men in the age of from 35 till 60 years with different stadies of diffusion liver diseases. Liver biopsy was carried out to evaluate the degree of liver fibrosis. To all men were carried out clinical, biochemical, instrumental and morphological inspections. In view of the morphological data patients were divided into two groups — the first group with the light and moderate liver fibrosis (F1-F2); the second — with the severe liver fibrosis and liver cirrhosis (F3-F4). There was a control group — 33 healthy men without liver (F0) and heart diseases. The studies were performed with

suspensions of erythrocytes using the ³¹P NMR spectroscopy (DRX 500, Bruker, Germany). Is experimentally established: area of peaks from glucos-6-phosphates, AMF, IMF, pyrophosphates, 2,3-DFG of erythrocytes are increased and area of peaks from inorganic phosphates, phosphocreatin, α -, β - and γ -ATP, UTF, Hb-, Mg-ATP are decreased with growing the degree of liver fibrosis. These ³¹P NMR parameters of erythrocytes can be used as additional characteristics of liver fibrosis degree with a enough high pronostic value (92,3%).

Литература

1. Панфилов С.А. Диагностика заболеваний печени, билиарного тракта с курсом патологической анатомии / С.А. Панфилов, Е.В. Панфилова. — М., 2003.
2. Ishak K.G. Chronic hepatitis morphology and nomenclature. / K.G. Ishak // Mod. Patbol. — 1994. — Vol. 7 — P. 690-713.
3. Knodell R.G. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing biological activity in asymptomatic chronic active hepatitis / R.G. Knodell, K.G. Ishak, W.C. Black // Hepatology. — 1981. — P. 431-435.
4. Ивашкин Н.Т. Болезни печени и желчевыводящих путей: Руководство для врачей / Н.Т. Ивашкин. — М., 2002.
5. Jardetsky O. NMR in molecular biology. / O. Jardetsky, G.C.K. Roberts. — London: Academic Press. — 1981.
6. Kiaran K. The contribution of magnetic susceptibility effects to transmembrane chemical shift differences in the ³¹P NMR Spectra of oxygenated erythrocyte suspensions. / K. Kiaran, P. W. Kuchel // J. of Biol. Chem. — 1987. — Vol. 263. — P. 130-134.
7. Seigneuret M. ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in erythrocyte membrane: relation of shape changes / M. Seigneuret, P.F. Devaux // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1987. — Vol. 81. — P. 3751-3755.
8. Геннис Г. Биомембраны: молекулярная структура и функция: Пер. с англ. / Г. Геннис. — М., 1997. — 431 с.
9. Конев С.В. Структурная лабильность биологических мембран и регуляторные процессы / С.В. Конев — Минск, 1987. — 240 с.
10. Мембраны и болезнь. Пер. с англ. / Под ред. Л. Болис, Д.Ф. Хоффман, А. Лиф. — М., 1980. — 408 с.
11. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты / Меньшикова Е.Б., Ланкин В.В., Зенков Н.К. и др. — М., 2006. — 553 с.
12. О роли 2,3-дифосфогицератного шунта в регуляции энергетического метаболизма в эритроцитах человека / Б.И. Холоденко, А.В. Степанчикова, Л.И. Эрлих и др. // Биохимия, серия биологическая. — 1985. — № 2. — С. 196-205.
13. Wanless I.K. Regression of human cirrhosis Morfologic features and the genesis of incomplete septal cirrhosis. / I.K Wanless, E. Nakashima, M. Sherman // Arch. Patbol. Lab. Med. — 2000. — Vol. 124. — P. 1599-1607.
14. Geller S.A. Hepatitis B and hepatitis C. / S.A. Geller // Clin. Liver Dis. — 2002. — Vol. 6 — P. 317-334.
15. Подымова С.Д. Болезни печени / С.Д. Подымова. — М.: Медицина, 1993. — 544 с.
16. Бугеверов А.О. Алкогольная болезнь печени / А.О. Бугеверов, М.В. Маевская, В.Т. Ивашкин // РМЖ. — 2001. — Т. 3. — № 2. — С. 39-42.