

## Использование ЯМР- и ИК спектроскопии для исследования крови в целях диагностики стадии заболевания при диффузной патологии печени

© М.В. Кручинина<sup>1,3</sup>, В.Н. Кручинин<sup>2</sup>, Г.В. Шувалов<sup>4</sup>, И.В. Минин<sup>5,6</sup>, О.В. Минин<sup>5,6</sup>

<sup>1</sup> НИИ терапии и профилактической медицины — филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН», 630089 Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова Сибирского отделения РАН, 630090 Новосибирск, Россия

<sup>3</sup> Новосибирский государственный медицинский университет, 630091 Новосибирск, Россия

<sup>4</sup> Федеральное государственное унитарное предприятие «Сибирский государственный ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский институт метрологии», 630004 Новосибирск, Россия

<sup>5</sup> Национальный исследовательский Томский государственный университет, 634050 Томск, Россия

<sup>6</sup> Сибирский государственный университет геосистем и технологий, 630005 Новосибирск, Россия

e-mail: kruchmargo@yandex.ru

Поступила в редакцию 16.12.2019 г.

В окончательной редакции 13.01.2020 г.

Принята к публикации 28.02.2020 г.

Обследованы 67 пациентов (средний возраст  $48 \pm 1$  год) с диффузными заболеваниями печени различного генеза. Установлено, что нарастание степени фиброза ассоциировано с повышением интенсивности резонансов глюкозо-6-фосфатов, аденозинмонофосфата (АМФ), инозинмонофосфата (ИМФ), пирофосфатов, 2,3-ДФГ и снижением резонансов неорганических фосфатов и фосфокреатина,  $\gamma$ -,  $\alpha$ - и  $\beta$ -АТФ, -УТФ, Hb- и Mg-АТФ, а также  $\beta$ - и  $\alpha$ -АДФ. Предсказательная ценность положительного результата  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектроскопии эритроцитов в отношении фиброза печени составляет 92.3% (чувствительность 85.71%, специфичность 80%). В ИК спектрах сывороток крови пациентов с выраженным фиброзом в отличие от умеренного фиброза выше интенсивность резонансов при 1280, 3190 и достоверно ниже при 776, 818, 889, 966, 1399, 1450, 1570, 1635  $\text{cm}^{-1}$ , что свидетельствует о наличии белковых молекул со вторичной структурой преимущественно в виде спирали ( $\alpha$ -helix) по сравнению со структурой в виде складчатого листа ( $\beta$ -sheet) ( $p < 0.001$ – $0.05$ ). Комбинированное использование  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектроскопии взвесей эритроцитов и ИК спектроскопии сыворотки крови позволило повысить диагностическую точность (96%), чувствительность (97%) и специфичность (91%) в различении степеней фиброза печени в отличие от изолированного использования данных методов.

**Ключевые слова:**  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектроскопия, ИК спектроскопия, эритроциты, сыворотка крови, диффузная патология печени, степень фиброза.

DOI: 10.21883/OS.2020.06.49411.16-20

### Введение

Несмотря на успехи современной гепатологии, по-прежнему диагностика диффузного поражения печени (ДПП) с определением степени фиброза и скорости его прогрессирования остается непростой задачей. В настоящее время используются как инвазивные (биопсия печени), так и малоинвазивные и неинвазивные методы, к которым относятся макроморфологические методы визуализации (УЗИ, КТ, ЯМРТ) и биохимические методы, основанные на изучении активности ферментов, принимающих участие в образовании и деградации внеклеточного комплекса [1]. Недостатками всех перечисленных методов являются высокая трудоемкость, необходимость

применения широкой номенклатуры различных ингредиентов, субъективизм, иногда противодействие со стороны пациента и т.д. [2]. Поэтому поиск новых подходов и методов неинвазивной диагностики фиброза печени весьма актуален.

Поскольку между расстройствами функций печени и гомеостазом крови существует тесная связь, для широкой клинической практики ценным диагностическим критерием состояния печени, в том числе степени накопления фиброза, может стать оценка структурных характеристик эритроцитов. В силу многочисленности эритроцитов основные физико-химические свойства крови определяются преимущественно этими клетками.

Одним из современных перспективных методов, позволяющих детально изучить структуру клеток, является ЯМР-спектроскопия [3–5], с успехом применявшаяся, в частности, для изучения динамической структуры мембран [4,5]. Наиболее важными ядрами при исследовании биологических объектов являются  $^{31}\text{P}$ ,  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ . Основной гипотезой исследования являлось предположение о наличии особенностей  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектров эритроцитов при различной выраженности фиброза печени и возможности использования структурных характеристик эритроцитов для его разграничения („легкий“–„тяжелый“ фиброз).

Для получения информации о компонентах сыворотки крови использовались данные ИК спектроскопии, поскольку известно, что прогрессирование ДПП ассоциировано со значительными биохимическими сдвигами [6].

В проведенных нами предшествующих исследованиях [7–13] показаны особенности макроэргических соединений эритроцитов, оптических характеристик сыворотки крови у пациентов с диффузной патологией печени различного генеза, различными стадиями заболевания, степенью компенсации, степенью фиброза, подтвержденной методом биопсии („золотого стандарта“ для гепатологии) лишь у ограниченного числа пациентов, что существенно снижало возможности сопоставления данных. Поэтому на данном этапе работы, имея клинико-диагностическую информацию о большем количестве пациентов, включая исследование методом непрямой эластометрии, нами предпринята попытка оценить возможность комбинированного использования двух методов  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектроскопии эритроцитов и ИК спектроскопии сыворотки для различения пациентов с ранними и поздними степенями фиброза печени.

Целью настоящей работы являлись исследование особенностей  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектров эритроцитов и ИК спектров сыворотки крови у пациентов с диффузными заболеваниями печени и оценка возможности комбинированного использования этих показателей для дискриминирования степени выраженности фиброза.

## Методы исследований

### Группы пациентов

В исследование включены 67 пациентов (средний возраст  $48 \pm 1$  год) с ДПП различного генеза. Группу сравнения составили 33 человека. Пациенты с ДПП разделены на две группы: с первой или второй стадиями фиброза (легкий и умеренный фиброз — F1-F2) — 45 человек и с третьей или четвертой стадиями фиброза (выраженный фиброз — F3-F4) — 22 пациента. Степень выраженности фиброза печени в группе ДПП установлена методом непрямой эластометрии на аппарате FibroScan® 502 Echosens (Франция) с разграничением стадии фиброза по шкале METAVIR от F0 до F4. У 19 пациентов с ДПП оказалась выполненной биопсия печени. Всем включенным в проект выполнены биохимические

и инструментальные исследования, УЗИ печени, селезенки, а также порталных 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 потреблении алкоголя.

### Образцы взвесей эритроцитов и сыворотки крови

Исследования проводились на взвесах эритроцитов, приготовленных в соответствии с методикой, подробно описанной в работе [7].

Для получения тонких пленок из сыворотки крови в настоящей работе использовался метод центрифугирования. Подробно получение и количественный и качественный эллипсометрический контроль пленок описаны в работе [13].

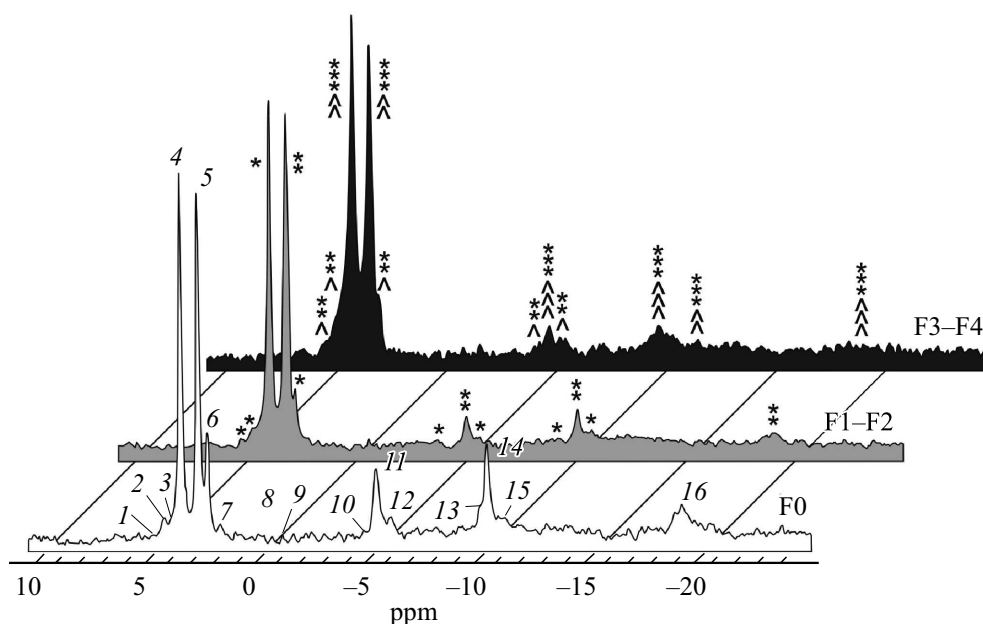
### $^{31}\text{P}$ ЯМР-, ИК-спектроскопия

ИК спектры записывались на ИК фурье-спектрометре BrukerVector 22 в диапазоне длин волн  $400\text{--}7000\text{ cm}^{-1}$  с разрешением  $2\text{ cm}^{-1}$ . Для удаления колебаний, связанных с многолучевой интерференцией, и линий, соответствующих поглощению паров воды и углекислого газа, использовалась программа OPUS 6.0.

$^{31}\text{P}$  ЯМР-спектры записывались на ЯМР-спектрометре BrukerDRX 500 (Германия) со следующими характеристиками: частота — 202.46 МГц; количество накоплений спектров — 1024; время задержки между накоплениями — 2 с; развертка — 80 миллионных долей (ppm) частоты прибора. Для накопления и обработки спектров использовалась программа XWIN-NMR, Version 3.1. Химические сдвиги отсчитывались от внутреннего стандарта — 2,3-ДФГ (хим. сдвиг: 3.3 ppm для 3-Р и 2.6 ppm для 2-Р). Высота пиков спектров оценивалась в процентном отношении к максимальному по высоте пику спектра. Ширина пиков измерялась в герцах (Hz). Интегральные интенсивности (площади резонансов) рассматривались как относительные величины (производные от площади реперного пика спектра, принятого за единицу площади).

### Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка данных выполнена с использованием программы SPSS, ver. 17. Определялся характер распределения количественных признаков методом Колмогорова-Смирнова. В случае нормального распределения вычислялось среднее значение ( $M$ ) и стандартная ошибка среднего ( $m$ ). Достоверность различия показателей оценивали по критериям Стьюдента, Пирсона (при нормальном распределении), в случаях



**Рис. 1.** Типичные  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектры взвесей эритроцитов лиц группы сравнения (F0) и больных с легким (F1-F2) и выраженным фиброзом (F3-F4): 202.46 МГц от 10 до  $-25$  ppm в  $\text{K}^+ - \text{Na}^+$ -буфере, pH7.36 при  $25^\circ\text{C}$ ; (внутренний стандарт — 2,3-ДФГ (хим. сдвиги: 3.3 ppm для 3-Р и 2.6 ppm для 2-Р). Цифрами на рисунке указаны составляющие пиков: 1 — глюкозо-6-фосфат; 2 — аденозинмонофосфат, глицерол-1-фосфат, глицеральдегид-3-фосфат; 3 — пиридоксальфосфат; 4 — 3-фосфоглицерат; 5 — 2-фосфоглицерат; 6 — неорганические фосфаты; 7 — фосфокреатин; 8 — сфингомиелин; 9 — фосфатидилхолин; 10 — гемоглобин-АТФ; 11 —  $\gamma$ -АТФ,  $\gamma$ -УТФ; 12 —  $\beta$ -АДФ,  $\beta$ -УДФ,  $\beta$ -ИДФ; 13 —  $\alpha$ -АДФ,  $\alpha$ -УДФ,  $\alpha$ -ИДФ; 14 —  $\alpha$ -АТФ,  $\alpha$ -УТФ; 15 — Mg-АТФ, замещенные пирофосфаты; 16 —  $\beta$ -АТФ,  $\beta$ -УТФ [14]. \* — достоверность различий от группы сравнения: \* —  $p < 0.05$ ; \*\* —  $p < 0.01$ ; \*\*\* —  $p < 0.001$ ;  $\Lambda$  — достоверность различий от группы с F1-F2:  $\Lambda$  —  $p < 0.05$ ;  $\Lambda\Lambda$  —  $p < 0.01$ ;  $\Lambda\Lambda\Lambda$  —  $p < 0.001$ .

отклонения распределения от нормального использовались непараметрические критерии (U-критерий Манна-Уитни, Колмогорова-Смирнова, хи-квадрат). Во всех процедурах статистического анализа критический уровень значимости нулевой гипотезы ( $p$ ) принимался равным 0.05. Для оценки значимости интенсивности пиков  $^{31}\text{P}$  ЯМР- и ИК спектров с точки зрения дифференцирования пациентов с легким и выраженным фиброзом печени был использован ROC-анализ.

## Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлены типичные  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектры взвеси эритроцитов у лиц группы сравнения (F0) и больных с легким (F1-F2) и выраженным фиброзом (F3-F4) с обозначением основных пиков [14].

Основными компонентами спектра оказались сигналы при 3.8 (3-Р) и 3.02 ppm (2-Р) 2,3-дифосфоглицерата (рис. 1). Заметными были резонансы неорганических фосфатов  $\text{P}_n$  (2.65 ppm) и монофосфатов (АМФ, ИМФ и др.) — 4.5–4.7 ppm; пирофосфата (4.18 ppm). Меньшей интенсивностью отличались сигналы три- и дифосфатов: три резонанса АТФ ( $\gamma$ -АТФ,  $\gamma$ -УТФ при  $-5.6$  ppm;  $\alpha$ -АТФ,  $\alpha$ -УТФ при  $-10.06$  ppm;  $\beta$ -АТФ,  $\beta$ -УТФ при  $-19.6$  ppm); пиками микроокружения гамма-АТФ и  $\alpha$ -АТФ являлись резонансы гемоглобин-АТФ ( $-4.5$  ppm),  $\beta$ -АДФ, УДФ, ИДФ ( $-6.2$  ppm),  $\alpha$ -АДФ, УДФ, ИДФ

( $-9.9$  ppm), Mg-АТФ ( $-10.7$ – $1.0$  ppm). Кроме того, при  $-3.13$  ppm регистрировались незначительно выраженные пики фосфокреатина и при  $-14.1$  ppm — сигналы замещенных пирофосфатов.

Анализ  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектров взвесей эритроцитов у больных с ДПП при различной степени выраженности фиброза позволил выявить преобладание величин пиков моно- и пирофосфатов у больных с выраженным фиброзом печени и большую выраженность резонансов ди- и трифосфатов у больных с легким фиброзом.

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  $^{31}\text{P}$  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 (коэффициент корреляции  $r = +0.423$ ,  $p < 0.034$ ). 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  $\gamma$ -,  $\alpha$ - и  $\beta$ -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  $\gamma$ -АТФ ( $r = -0.478$ ,  $p < 0.03$ ) и  $\alpha$ -АТФ ( $r = -0.352$ ,  $p < 0.05$ ). Установлены отрицательные корреляции выраженности пиков  $\gamma$ -,  $\alpha$ - и  $\beta$ -АТФ с уровнем сывороточного железа ( $r = -0.375$ ,  $p < 0.034$  для  $\gamma$ -АТФ;  $r = -0.269$ ,  $p < 0.04$  для  $\alpha$ -АТФ;  $r = -0.498$ ,  $p < 0.053$  для  $\beta$ -АТФ) в группе пациентов со степенью фиброза F3-F4.

Следует отметить, что большее по площади пост- $\gamma$ -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- $\alpha$ -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  $\alpha$ - и  $\gamma$ -УТФ, Нб- и Mg-АТФ, а также  $\beta$ - и  $\alpha$ -АДФ были достоверно выше у больных первой группы (F1-F2) по сравнению со второй группой (F3-F4). Интересно, что частота регистрации резонансов  $\gamma$ -УТФ, Нб-АТФ (пик 10) и  $\alpha$ -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)  $p < 0.05$ .

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  $^{31}\text{P}$  и форму линий сигналов  $^{31}\text{P}$ -содержащих метаболитов, особенно 2,3-ДФГ и АТФ. 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.

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 [2, 6] 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.

Анализ полученных данных позволил выделить дискриминирующие значения характеристик резонансов  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектров эритроцитов для пациентов с различными стадиями фиброза. Наиболее важными дискриминирующими показателями степени фиброза печени являются характеристики резонансов: глюкозо-6-фосфата, 2,3-ДФГ,  $\gamma$ -,  $\alpha$ -,  $\beta$ -АТФ, УТФ, Mg-АТФ,  $\beta$ - и  $\alpha$ -АДФ, УДФ, плато  $\alpha$ -АТФ. Для отделения легкого, невыраженного фиброза (F1-F2) от выраженной стадии (F3-F4) возможно также использование параметров пиков пиридоксальфосфатов, неорганических фосфатов, фосфокреатина и „плато“ пост- $\gamma$ -АТФ.

Результаты оценки методом ЯМР-спектроскопии эритроцитов для выявления стадии фиброза печени по сравнению с данными биопсии печени („золотого стандарта“ для оценки стадии фиброза) показали достаточно высокие значения чувствительности (85.71%) и специфичности (80%), а также прогностическую ценность „+“ результата (92.31%).

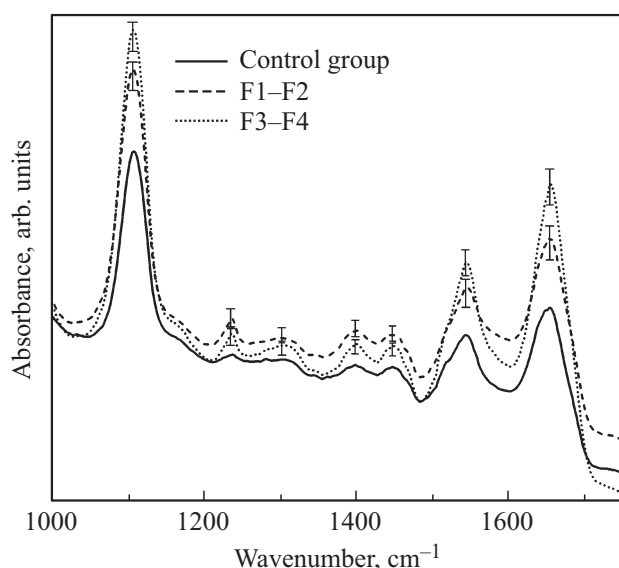
Известно о наличии постоянного обмена эритроцитов с компонентами сыворотки крови [15], что делает логичным применение ИК спектроскопии для ее изучения.

Прогрессирование ДПП сопровождается выраженными сдвигами биохимических параметров, что отразилось на данных ИК спектров. Особое внимание уделялось анализу амидных групп Amide I, Amide II, Amide III, которые связаны с поглощением ИК излучения фрагментами  $\text{O}=\text{C}-\text{N}-\text{H}$ , чувствительными к вторичной структуре белковых молекул ( $\alpha$ -helix,  $\beta$ -sheet, randomcoil). В свою очередь, изменение вторичной структуры белковых молекул определяется наличием патологических процессов в организме, в том числе и при диффузной патологии печени при различной степени фиброза.

В ИК спектрах у пациентов с выраженным фиброзом печени F3-F4 достоверно выше, чем в группе пациентов с F1-F2, оказались пики амид III — при  $1280\text{ cm}^{-1}$  в диапазоне спектра основных амидных полос поглощения и пик при  $3190\text{ cm}^{-1}$ , отражающий N-H-структуры, а также достоверно чаще наличие белковых

Результаты ROC-анализа методов  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектроскопии и ИК спектроскопии для различения „легкого“ и „выраженного“ фиброза печени

Методы исследования	Диагностическая точность	Чувствительность	Специфичность	AUC
$^{31}\text{P}$ ЯМР-спектроскопия	0.82	0.86	0.8	0.81
ИК спектроскопия	0.71	0.56	0.85	0.64
Комбинированное использование $^{31}\text{P}$ ЯМР- и ИК спектроскопии	0.96	0.97	0.91	0.95



**Рис. 2.** Фрагменты ИК спектров сыворотки крови пациентов с разной степенью фиброза печени и обследуемых группы сравнения.

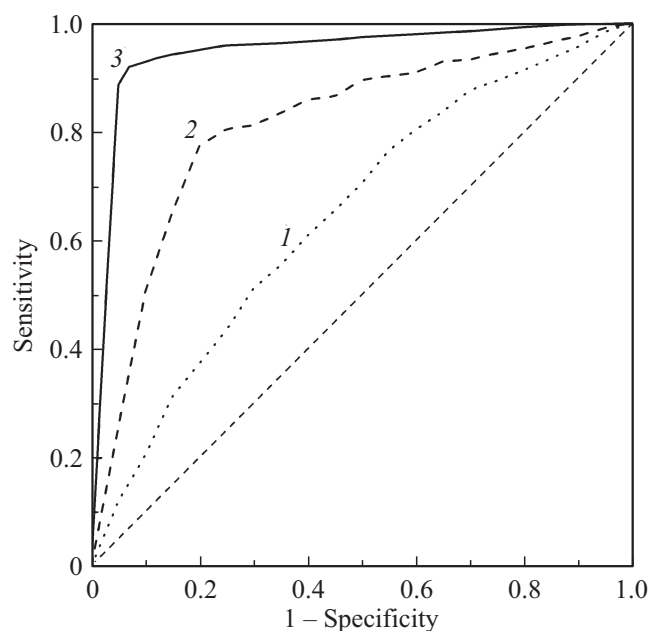
молекул со вторичной структурой в виде спирали ( $\alpha$ -helix) ( $p < 0.001-0.05$ ) (рис. 2).

Напротив, у пациентов со степенью фиброза F3-F4 достоверно ниже, чем в группе F1-F2, были пики при  $776, 818, 889$  и  $966\text{ cm}^{-1}$ , характерные для валентных колебаний связей C—C, C—O дезоксирибоз и фрагмента  $\text{PO}_4^-$  молекул нуклеиновых кислот и протеинов [16] ( $p < 0.02-0.05$ ). Достоверное снижение при выраженном фиброзе продемонстрировал также ряд пиков при  $1399\text{ cm}^{-1}$ , отражающий симметричные валентные колебания групп  $\text{CH}_3$  скелетных фрагментов молекул белков; при  $1450\text{ cm}^{-1}$ , отражающий деформационные колебания групп  $\text{CH}_3$  липидов и белков; при  $1570\text{ cm}^{-1}$  (амид II);  $1581, 1620\text{ cm}^{-1}$  (карбонильные структуры) ( $p < 0.01-0.05$ ). Значимое снижение компоненты при  $1635\text{ cm}^{-1}$ , выявляющейся при разложении сложных амидных пиков, у пациентов с фиброзом печени F3-F4 связывают со снижением количества белковых молекул со структурой в виде складчатого листа ( $\beta$ -sheet) ( $p < 0.05$ ). Полученные данные отражают выраженность проявлений основных печеночных синдромов при прогрессировании ДПП — нарушения синтетической функ-

ции печени, синдромы цитолиза, холестаза, иммуно-воспалительный [6]. Косвенные признаки диспротеинемии, выявленные ИК спектроскопией, вероятно, оказывают влияние на состояние мембран эритроцитов, приводя к снижению их заряда, условий функционирования мембраносвязанных ферментных систем, что сказывается на метаболизме фосфоросодержащих соединений клеток красной крови [17].

Для того чтобы оценить возможности методов в различении „легкого“ и „выраженного“ фиброза при диффузной патологии печени, был проведен ROC-анализ с использованием интенсивностей сигналов  $^{31}\text{P}$  ЯМР- и ИК спектров по отдельности, а затем при комбинированном применении двух оптических методов (таблица, рис. 3).

Полученные данные позволяют сделать вывод о повышении диагностической точности в различении степеней фиброза печени (96%) при достаточно высоких уровнях чувствительности (97%) и специфичности (91%) при од-



**Рис. 3.** ROC-кривые при изолированном использовании интенсивностей сигналов ИК спектроскопии сыворотки крови (1),  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектроскопии взвеси эритроцитов (2) и комбинированном применении данных методов (3) для определения степени фиброза печени.

номоментном использовании двух методов исследования крови.

Внедрение в широкую клиническую практику метода непрямой эластометрии печени существенно расширило возможности определения степени фиброза, ранее в значительной части случаев устанавливаемого лишь косвенно. Поскольку данное исследование является общепринятым в мировой гепатологической практике, появилась возможность его использования как некоего стандарта, с данными которого сопоставляют информацию, полученную другими методами [18,19]. Однако и непрямая эластометрия при ее очевидных преимуществах (высокая скорость выполнения, получение информации об объеме печени в 100 раз большем, чем при проведении биопсии, неинвазивность, воспроизводимость результатов) имеет определенные ограничения: зависимость от квалификации оператора, сложность или невозможность проведения исследования у пациентов с анатомическими особенностями, ожирением, узкими межреберными промежутками, с асцитом в случае цирроза печени, с желчно-каменной болезнью, наличием протезов, искусственных водителей ритма, неоднозначность получаемых результатов в случае наличия у пациентов синдромов перегрузки железом, медью, выраженных синдромов цитолиза, холестаза, иммуновоспалительного, которые завышают полученный результат и не отражают истинную степень фиброза печени [20,21]. Следует учитывать, что на ранних стадиях фиброза чувствительность метода невысока, зависит от этиологии процесса (от 25% в случае F1, 33% при F2 для неалкогольной жировой болезни печени, 33–71.4% для F1-2 при хронических вирусных гепатитах [22], до 66% для F0-1 [23]).

В связи с этими обстоятельствами результаты, полученные в настоящем исследовании, представляются перспективными для объективизации определения степени фиброза печени.

## Заключение

Таким образом, показано, что 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, пирозинатов, 2,3-ДФГ и понижение пиков, представляющих резонансы неорганических фосфатов и фосфокреатина,  $\gamma$ -,  $\alpha$ - и  $\beta$ -АТФ, УТФ, Нб- и Mg-АТФ, а также  $\beta$ - и  $\alpha$ -АДФ. При выраженной степени фиброза (F3-F4) чаще регистрируются пост- $\gamma$ -АТФ-плато и пост- $\alpha$ -АТФ-плато. Предсказательная ценность положительного результата  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектроскопии эритроцитов в отношении фиброза печени в сравнении с биопсией печени составляет 92.3% при достаточно высокой чувствительности и специфичности. Выявленные изменения ИК-спектров, ассоциированные с прогрессированием степени фиброза

печени, отражают выраженность биохимических сдвигов при продвинутых стадиях заболевания [24]. С другой стороны, они, вероятно, усугубляют сдвиги в паттерне фосфоорганических соединений эритроцитов. Комбинированное использование  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектроскопии взвесей эритроцитов и ИК спектроскопии сыворотки крови позволило повысить диагностическую точность (96%), чувствительность (97%) и специфичность (91%) в различении степеней фиброза печени в отличие от изолированного использования методов.

Представленные результаты позволяют рассматривать  $^{31}\text{P}$  ЯМР- и ИК спектроскопию как чувствительные прецизионные методы, которые можно эффективно использовать в современных биомедицинских исследованиях, в частности, в вопросах диагностики заболеваний, в том числе, ранних стадий процессов.

## Финансирование работы

Работа выполнена в рамках темы „Эпидемиологический мониторинг состояния здоровья населения и изучение молекулярно-генетических и молекулярно-биологических механизмов развития распространенных терапевтических заболеваний в Сибири для совершенствования подходов к их диагностике, профилактике и лечению“ ГЗ № 0324-2018-0001, Рег. № АААА-А17-117112850280-2.

## Соблюдение этических стандартов

Обследование выполнено с одобрения Комитета Биомедицинской Этики ФГБНУ „НИИТПМ“ (12.2015). Все обследуемые заполняли информированное согласие пациента на участие в обследовании.

## Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## Список литературы

- [1] *Ивашкин Н.Т., Павлов Ч.С.* Фиброз печени. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. 168 с.
- [2] *Радченко В.Г., Шабров А.В., Зиновьева Е.Н., Ситкин С.И.* Заболевания печени и желчевыводящих путей: руководство для врачей. СПб.: СпецЛит, 2011. 560 с.
- [3] *Ziarek J.J., Baptista D., Wagner G.* // J. Mol. Med. (Berl.) 2018. V. 96. N 1. P. 1.
- [4] *Ferlazzo A.M., Bruschetta G., Di Pietro P., Medica P., Notti A., Rotondo E.* // Vet. Res. Commun. 2011. V. 35. N 8. P. 521.
- [5] *Thulborn K.R.* // Neuroimage. 2012. V. 62. N 2. P. 589.
- [6] *Подымова С.Д.* Болезни печени. Руководство для врачей. М.: Медицинское информационное агентство, 2018. 984 с.
- [7] *Кручинина М.В., Курилович С.А., Паруликова М.В., Громов А.А., Шакиров М.М.* // Бюллетень Сибирского отделения РАМН. 2006. Т. 4. № 122. С. 108.

- [8] Кручинина М.В., Курилович С.А., Паруликова М.В., Шакиров М.М. // Приложение к журналу „Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология, гепатология“. 2003. № 2. С. 28.
- [9] Курилович С.А., Кручинина М.В., Громов А.А., Немцова Е.Г., Генералов В.М., Бакиров Т.С., Шакиров М.М., Рихтер В.А., Семенов Д.В. // Бюллетень Сибирского отделения РАМН. 2011. Т. 31. № 6. С. 21.
- [10] Воевода М.И., Кручинина М.В., Пельтек С.Е., Курилович С.А., Кручинин В.Н., Спесивцев Е.В., Рыхлицкий С.В., Володин В.А., Генералов В.М., Герасимов В.В., Князев Б.А. // Архив внутренней медицины. 2012. № 4. С. 46.
- [11] Kruchinina M., Voevoda M., Peltek S., Kurilovich S., Gromov A., Kruchinin V., Rykhlytsky S., Volodin V., Generalov V. // J. Analytical Sciences, Methods and Instrumentation. 2013. V. 3. N 2. P. 115.
- [12] Kruchinina M., Gromov A., Generalov V., Kruchinin V., Shuvalov G., Minin O.V., Minin I.V. // Proc. SPIE 11065. Saratov Fall Meeting 2018: Optical and Nano-Technologies for Biology and Medicine, 110650V (3 June 2019).
- [13] Воевода М.И., Пельтек С.Е., Кручинина М.В., Курилович С.А., Кручинин В.Н., Могильников К.П., Рыхлицкий С.В. // Автометрия. 2010. Т. 46. № 4. С. 106.
- [14] Jardetsky O., Roberts G.C.K. NMR in Molecular Biology. London: Academic Press., 1981. 698 p.
- [15] Gutu M., Rusu V., Avadanei M., Stefanescu C., Stoica B. // Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi. 2011. V. 115. N 3. P. 881–888.
- [16] Дизрегуляторная патология системы крови. / Под ред. Гольдберга Е.Д., Крыжановского Г.Н. Изд-во „Медицинское информационное агентство“, 2009. 432 с.
- [17] Шиффман Ф.Дж. Патология крови. М.: Изд-во „Бином“, 2019. 448 с.
- [18] Kemp W., Roberts S. // Australian Family Physician. 2013. V. 42. N 6. P. 468.
- [19] Dietrich C.F., Bamber J., Berzigotti A., Ferraioli G. // Ultraschall in Med. 2017. V. 38. P. 327.
- [20] Ивашкин В.Т., Павлов Ч.С. Фиброз печени. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. 168 с.
- [21] Кручинина М.В., Курилович С.А., Громов А.А., Генералов В.М., Сафатов А.С., Буряк Г.А., Шувалов Г.В. // Архив внутренней медицины. 2017. Т. 7. № 2. С. 121–130.
- [22] Лазебник Л.Б., Винницкая Е.В., Шапошникова Н.А., Хомерики С.Г., Никаноров А.В., Терехин А.А., Воробьева Н.Н., Голованова Е.В. // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2010. № 5. С. 10–13.
- [23] Вялов С.С. // Архив внутренней медицины. 2012. Т. 5. С. 48–57.
- [24] Кручинина М.В., Прудникова Я.И., Громов А.А., Генералов В.М., Генералов Л.В., Кручинин В.Н., Кручинина Э.В., Шувалов Г.В., Яковина И.Н., Баннова Н.А., Минин О.В., Минин И.В. // Опт. и спектр. 2019. Т. 126. № 5. С. 650.