

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ ФУНКЦИИ ПЕЧЕНИ УГЛЕРОДНЫМ ИЗОТОПНЫМ ДЫХАТЕЛЬНЫМ ТЕСТОМ

Гришина В.Г., Невмержицкий В.И., Сенченков С.А.,

РНЦ «Курчатowski институт», ИМФ, 123082, Москва, пл. ак. Курчатова, 1
тел./факс (7-499) 196-04-07
e-mail: nevy314@gmail.com

Новрузбеков М.С., Чжао А.В.

НИИ скорой помощи им. Н.В.Склифосовского, Москва, Большая Сухаревская площадь, 3
e-mail: n.m.s@bk.ru

Идея использования различных соединений, меченных изотопами углерода, в изотопных дыхательных тестах для исследования метаболической функции печени была предложена в середине 70-х годов прошлого века /1/ задолго до получившего в настоящее время широкое распространение углеродного изотопного уреазного дыхательного теста по диагностике инфекции желудка бактериями *Helicobacter Pylori*. Необходимость в появлении таких тестов была очевидна тогда и она не менее очевидна сегодня, т.к. до сих пор не существует общепринятого лабораторного параметра, позволяющего количественно оценить метаболическую функцию печени. В процессе последующих исследований, направленных на реализацию этой идеи, были предприняты попытки использовать более десятка соединений/2-4/, меченных изотопами углерода – стабильным ^{13}C либо радиоактивным ^{14}C . В целом эти соединения можно разделить на три группы, в соответствии с тем, какие ферментные системы печени задействованы в их метаболизме (см. Табл.1).

Дыхательный тест с использованием каждого из указанных соединений фактически представляет из себя исследование метаболизма этого соединения и нарушений этого метаболизма при различных формах заболеваний печени. Решение обратной задачи – постановка диагноза по характеру метаболизма этого соединения представляется весьма сложной задачей, далеко не всегда имеющей единственное решение. Это происходит, прежде всего, потому, что печень является сложным многофункциональным органом с большим запасом прочности и сложным характером взаимосвязей между различными функциями и параметрами ими управляющими. Кроме того, большинство указанных соединений метаболизируется при участии различных ферментных систем цитохрома P450, которые подвержены генетическому полиморфизму. Как правило, это приводит к тому, что в экспериментальных результатах появляются значительные разбросы измеряемых величин, относящихся как к контрольным группам испытуемых, так и к группам пациентов с одним и тем же клинически установленным диагнозом. Зачастую результаты, полученные для различных групп, имеют значительные области пересечений. Очевидно, что такая ситуация не способствует популярности этой диагностической методики. Следующими факторами, ограничивающими её применение, является высокая стоимость используемых препаратов, а также высокая стоимость оборудования и его недостаточная распространённость. Отметим, всё же, что последнее обстоятельство становится менее значимым, в связи с тем, что все углеродные изотопные дыхательные тесты можно проводить на одном и том же оборудовании для измерения изотопного состава углерода в выдыхаемом воздухе – специализированных масс-спектрометрах или ИК-спектрометрах, серийное производство которых налажено во многих странах мира. В этом

Табл.1. Наиболее распространённые соединения для диагностики функции печени изотопным дыхательным тестом

СОЕДИНЕНИЕ	МЕТАБОЛИЗМ	ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ
¹³ C ₂ -аминопирин	СYP - различные	Оценка активности микросомальных ферментов P450. Оценка функциональной массы печени. Дифференциация циррозов. Контроль печёночных трансплантатов.
¹³ C-метацетин	СYP - различные	Оценка активности микросомальных ферментов P450. Оценка функциональной массы печени. Дифференциация циррозов. Контроль печёночных трансплантатов.
¹³ C-фенацетин	СYP - различные	Оценка активности микросомальных ферментов P450. Оценка функциональной массы печени. Дифференциация циррозов. Контроль печёночных трансплантатов.
¹³ C ₂ -эритромицин	СYP3A4	Оценка активности фермента СYP3A. Фармакологические исследования. Индивидуальная фармакотерапия
1,3,7- ¹³ C-коффеин	СYP1A2	Оценка активности фермента СYP1A2. Фармакологические исследования. Индивидуальная фармакотерапия
1- ¹³ C-фенилаланин	Цитозольные ферменты	Оценка функциональной массы печени. Оценка динамики заболевания. Диагностика врождённых нарушений метаболизма.
1- ¹³ C-галактоза	Цитозольные ферменты	Оценка функциональной массы печени. Оценка динамики заболевания. Диагностика врождённых нарушений метаболизма
1- ¹³ C -метионин.	Митохондриальные ферменты	Оценка митохондриальной метаболической функции печени.
1- ¹³ C-кетоизо-капроновая кислота	Митохондриальные ферменты	Оценка митохондриальной метаболической функции печени. Дифференциация ASH и NASH
1- ¹³ C-Каприловая кислота	Митохондриальные ферменты	Оценка митохондриальной метаболической функции печени.

смысле можно надеяться, что «золотой стандарт» в диагностике инфекции H-Rylogi – углеродный изотопный уреазный дыхательный тест станет стартовой площадкой для развития и клинического применения других дыхательных тестов.

Несмотря на отмеченные выше значительные межиндивидуальные различия в результатах дыхательных тестов по исследованию метаболической функции печени, полученных для одной и той же группы испытуемых, отметим, что результаты, полученные для отдельных испытуемых из контрольной группы в течение достаточно длительного промежутка времени (около года) хорошо повторяются. Это указывает на возможность широкого применения этого теста для регулярного мониторинга функционального состояния печени, проводимого, как по желанию пациентов, так и в рамках периодически проводимых диспансеризаций для сотрудников предприятий с вредными условиями труда и повышенным для здоровья риском (например, сотрудники химических предприятий и лабораторий). Ещё одна область, где применение теста представляется весьма ценным – это контроль результатов проводимой терапии печени. И, наконец, мониторинг функции печени при проведении

хирургических операций на этом органе: трансплантации печени или гепатэктомии. Собственно, последней задаче и была посвящена настоящая работа.

Выбор препарата

В соответствии с задачами, которые ставятся перед исследованием должен быть выбран препарат - как правило, это один из представленных в Табл.1. Каждый из представленных препаратов позволяет исследовать определённые аспекты его метаболизма в печени, и в силу целостности печени, как органа, - в некоторой степени, метаболическую функцию печени в целом.

Как известно, метаболизм любого препарата в печени характеризуется такими величинами как V_D – объём распределения препарата, $Cl_{S,H}$ – системный клиренс препарата в печени, f - свободная фракция препарата, $Cl_{INT,H}$ - специфический клиренс препарата ферментной системой печени, E - экстракция препарата при прохождении через печень, Q – скорость печёночного кровотока. Согласно венозной равновесной модели:

$$Cl_s = Q * E = \frac{QfCl_{int}}{Q + fCl_{int}} \quad (1)$$

Результаты дыхательного теста фактически определяются величиной системного клиренса, т.к. характерное время выведения изотопной метки пропорционально отношению объёма распределения препарата к величине системного клиренса. Если величина специфического клиренса препарата значительно превышает величину печёночного кровотока, то системный клиренс определяется, в основном, величиной печёночного кровотока; в случае, когда выполняется обратное соотношение, системный клиренс определяется специфическим печёночным клиренсом, т.е. в нашем случае активностью исследуемой ферментной системы. Примером препарата с потокозависимым метаболизмом является галактоза; для извлечения информации об активности ферментов необходимо повышать концентрацию препарата до перехода в нелинейную область кинетики. Примером препарата с ферментозависимым метаболизмом может служить аминопирин. Минусами этого препарата являются относительно невысокая скорость экскреции изотопной метки, необходимость повышения дозировки, прекращение употребления этого препарата в качестве анальгетика в связи возможным негативным воздействием на почки.

Препарат ^{13}C -метацетин (N-(4-метокси- ^{13}C -фенил) ацетамид) представляет золотую середину, когда влияние гемодинамики и активности ферментной системы одинаково важно для результатов теста.

Методика проведения теста.

Препарат применялся перорально с фиксированной дозировкой 100 мг на одно исследование в виде раствора в 200 мл воды. Первым метаболическим процессом, которому подвергается препарат, является O-деметилирование – отщепление меченой изотопом ^{13}C метильной группы, происходящее при каталитическом воздействии энзимов системы цитохромов печени P450 с синтезом формальдегида (Рис.1). В дальнейшем метка входит в состав муравьиной кислоты и бикарбонат-иона и выводится через лёгкие в виде

Наряду с изотопным тестом у пациентов проводились полные биохимические анализы крови, ультразвуковые исследования, гистология тканей печени.

Пациенты.

Данная работа не задумывалась изначально, как классическое клиническое исследование; исследования метаболической функции печени углеродным дыхательным тестом проводилось для пациентов, находящихся в листе ожидания на трансплантацию печени или гепатэктомию по поводу злокачественных опухолей, поэтому предварительного отбора пациентов по различным группам с однородными показателями не производилось. Необходимые выборки производились впоследствии на основании фактически накопленного материала. Было обследовано 50 пациентов с поражениями печени различной тяжести и этиологии. Основные характеристики образованных групп приведены в Табл.2.

Табл.2. Пациенты, прошедшие тест

	А	В	С	ВСЕГО
Контрольная группа				6
Цирроз алкогольный		4	2	6
Первичный биллиарный цирроз	2	1	2	5
Цирроз HBV		4	3	7
Цирроз HCV		4	2	6
Другие циррозы	5	4	7	16
Рак печени				6
Метастазы				4
ВСЕГО	7	17	16	56

Показатели дыхательных тестов для контрольной группы совпадали с результатами, опубликованными в литературе/6,7/, поэтому её состав остался столь незначительным. У большинства пациентов в дальнейшем были проведены операции трансплантации печени или гепатэктомии. При этом проводились повторные изотопные дыхательные тесты спустя 4, 15 и 30 дней после проведения операции с целью контроля восстановления функции печени. Всего было проведено 120 изотопных дыхательных тестов.

Результаты.

Типичная для контрольной группы картина скорости появления изотопной метки в выдохе представлена на рис.2. Скорость быстро растёт, достигая максимума между 10-й и 20-й минутами после приёма препарата и затем падает с близкой к экспоненциальной зависимостью с характерным временем 40-60 мин. Максимальная скорость составляет от 20 до 50% в час для контрольной группы. Суммарная доля выводимой изотопной метки составляет для контрольной группы от 23 до 37% к исходу второго часа после приёма препарата.

При нарушении метаболической функции печени, вызванное различными патологиями наблюдается снижение скорости вывода изотопной метки и увеличение времени после приёма препарата, в течение которого достигается максимум скорости. При тяжёлых формах заболеваний печени скорость вывода

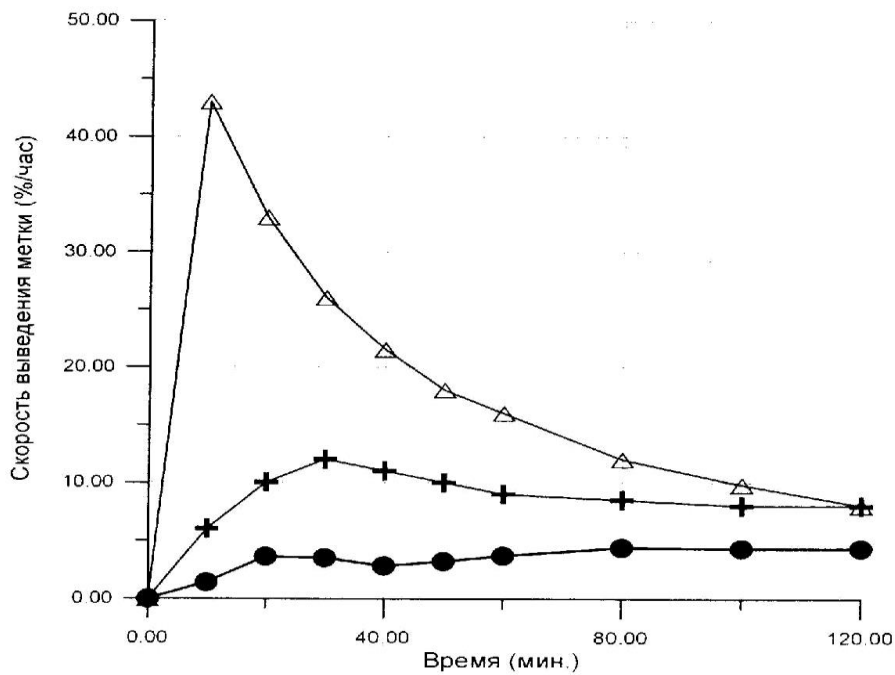


Рис.2. Характерные зависимости скорости выведения изотопной углеродной метки от времени. Δ - контрольная группа; + - цирроз А; o – цирроз С.

изотопной метки находится на очень низком уровне и практически не изменяется в течение двух часов, когда производятся заборы образцов выдыхаемого воздуха.

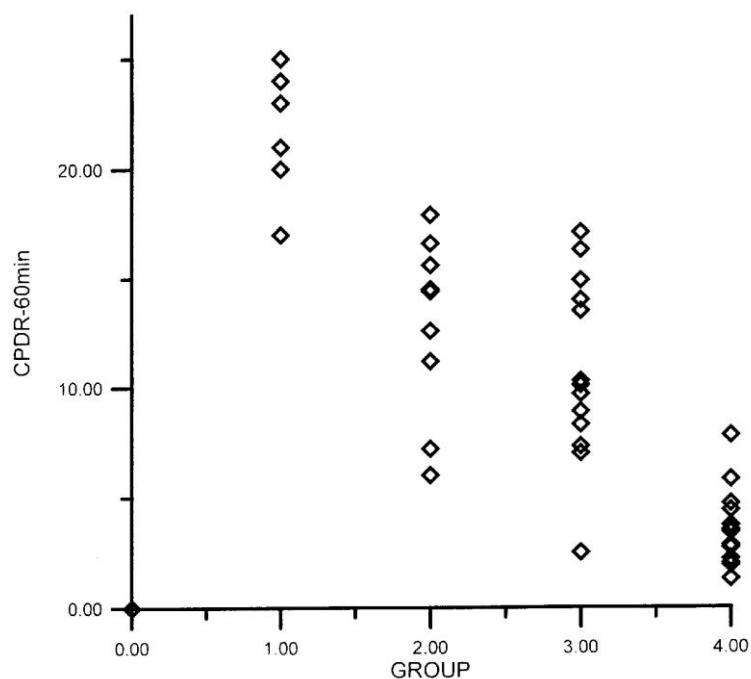


Рис.3. Зависимость суммарной доли (%) изотопной метки, выведенной через 1 час после приёма препарата для различных категорий пациентов. 1 – контрольная группа; 2 – цирроз А; 3 – цирроз В; 4 – цирроз С.

Прежде всего, отметим, что основную часть пациентов, прошедших исследование, составляли больные циррозами печени различной этиологии. Для оценки степени тяжести цирроза в настоящее время принята шкала Чайльд-Пью. Это синтетическая шкала, учитывающая различные показатели, важные для функционирования этого жизненно важного органа. Среди этих показателей уровень билирубина, уровень альбумина, наличие печеночной энцефалопатии и асцита. Полученные результаты дыхательных тестов показали удовлетворительную корреляцию показателей изотопного дыхательного теста со степенью тяжести поражения печени при циррозах различной природы, оценённой по шкале Чайльд-Пью, что согласуется с литературными данными [7]. Фактором, препятствующим установлению более полной корреляции, является наличие значительного межиндивидуального разброса показателей дыхательного теста для различных групп пациентов, в т. ч. и контрольной группы. На Рис. 3 показана величина суммарной доли выведенной метки через 1 час после приёма препарата для различных групп пациентов. Отметим, что использование в качестве диагностического параметра суммарной доли выводимой метки через различные промежутки времени после приёма препарата, даёт сходные результаты. Анализ показывает, что показатели CPDR через 20, 60 и 120 мин. после приёма препарата статистически скоррелированы. Для изучения влияния различных составляющих шкалы Чайльд-Пью на результаты дыхательного теста были построены зависимости величины CPDR-60мин от уровня альбумина в плазме крови и от содержания желчных кислот. Содержание альбумина влияет на величину свободной фракции препарата в плазме крови f (см. уравнение 1). Можно было бы ожидать, что снижение содержания альбумина приводит к увеличению свободной фракции и увеличению скорости метаболизма. Однако этого не происходит. На Рис.4 представлена зависимость CPDR-60мин от уровня альбумина для группы пациентов с циррозом А. Наблюдается очевидный рост скорости метаболизма с

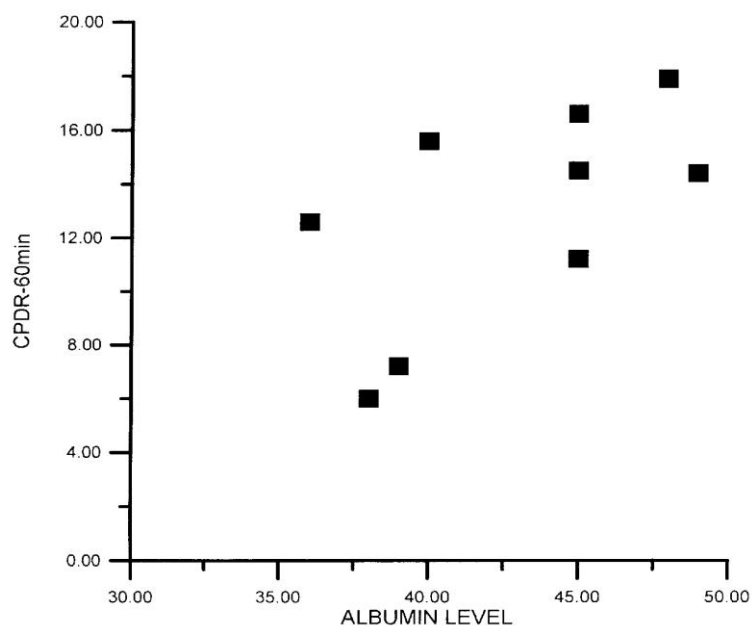


Рис. 4. Зависимость показателей углеродного дыхательного теста от уровня альбумина в плазме крови для пациентов с циррозом А.

ростом содержания альбумина. Наиболее вероятным объяснением, на наш взгляд, может служить следующее. При значительных величинах специфического печеночного клиренса при прохождении крови через печень устанавливается сильно неравновесное распределение препарата между свободной фракцией и фракцией, связанной с альбумином. Это приводит к тому, что заметная часть связанного препарата диссоциирует непосредственно при прохождении через печень и участвует в метаболизме. Таким образом, в метаболизме эффективно участвует не только свободная фракция препарата, но и весь препарат плазмы, включая связанную его часть. В то же время низкий уровень альбумина, хотя и приводит к повышению свободной фракции препарата на этапе абсорбции, впоследствии ведёт к тому, что значительная часть препарата из свободной фракции связывается с белками периферийных тканей. При этом существенно увеличивается объём распределения препарата и затрудняется его доступность для печёночного метаболизма.

Известно, что уровень желчных кислот в крови является косвенным показателем степени порто-системного шунтирования. Наличие шунтирования снижает эффективный кровоток через печень и в соответствии с уравнением (1) снижается печеночный клиренс. Иллюстрацией сказанному является приведённая на Рис.5 зависимость показателей дыхательного теста CPDR-60мин от уровня желчных кислот в плазме крови. Повышение уровня желчных кислот в плазме крови действительно коррелирует со значительным снижением скорости метаболизма препарата..

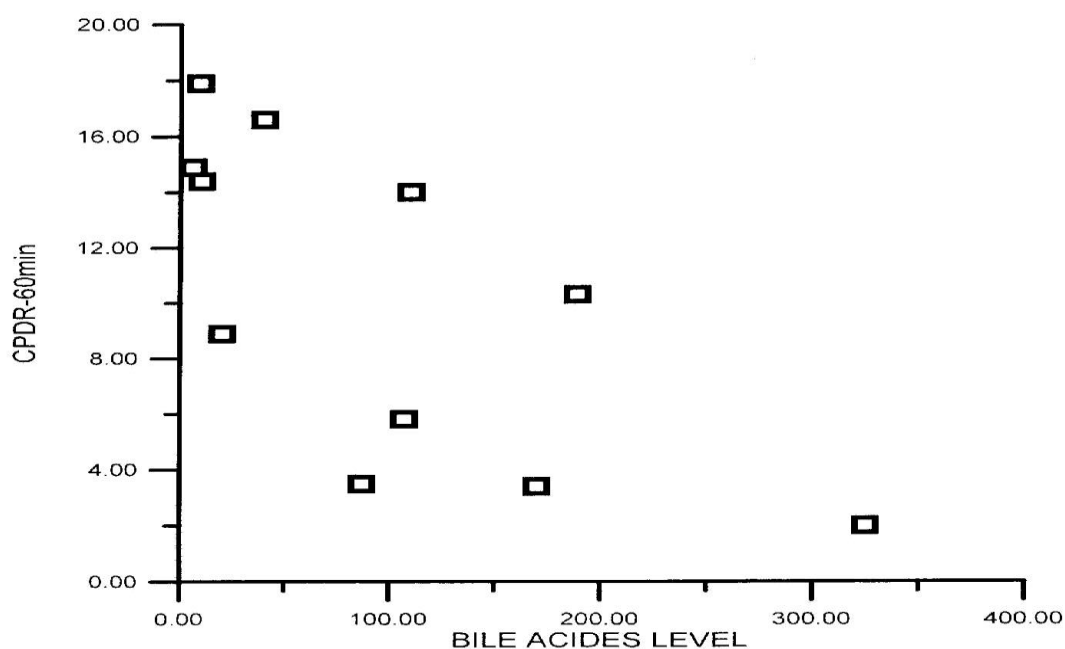


Рис.5. Зависимость показателей дыхательного теста CPDR-60мин от уровня желчных кислот в плазме крови.

При проведении операций трансплантации печени и гепатэктомии изотопные дыхательные тесты проводились перед операцией и спустя 4, 15 и 30 дней после её проведения с целью контроля восстановления функции печени. Полученные результаты наглядно демонстрируют постепенный рост метаболизма препарата и выход на параметры, соответствующие нормально функционирующей печени в случае успешного исхода операций или накопление негативных признаков

(снижение скорости метаболизма, увеличение времени достижения максимальной скорости) при наличии постоперационных осложнений.

Дыхательные тесты, проведённые для пациентов со злокачественными опухолями, показали, что в случае, если развитие заболевания не происходит на фоне цирроза, абсолютные величины скоростей вывода изотопной метки, как правило, остаются в пределах нормы. Вместе с тем примерно в половине случаев у таких пациентов наблюдается значительная временная задержка метаболизма метацетина (см. Рис.6). После проведения операции эта задержка исчезает. Наиболее вероятной причиной таких особенностей временного хода метаболизма, на наш взгляд, являются нарушения печёночного

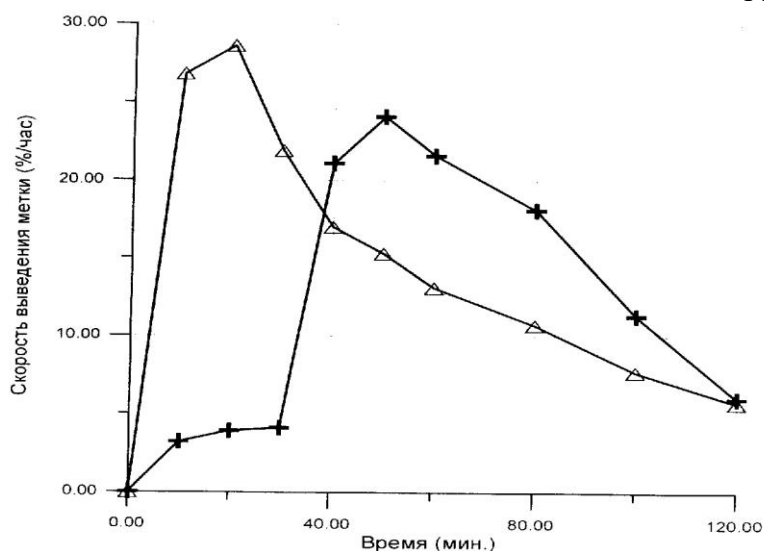


Рис.6. Результаты дыхательного теста для пациента с метастазами 2-3 доли печени. + - до операции; Δ - через 5 дней после частичной гепатэктомии.

кровообращения, связанные с ростом опухолевых новообразований. После проведения резекции и восстановления кровоснабжения метаболическая функция восстанавливается полностью при низком отношении резекции паренхимы /8/.

Выводы.

В условиях отсутствия в клинической практике функциональных печёночных тестов, показывающих удовлетворительные результаты при различных заболеваниях понятен растущий интерес к изотопным дыхательным тестам с использованием соединений, меченных изотопом С-13. К достоинствам теста с использованием ¹³С-метацетина следует отнести:

1. неинвазивность теста;
2. почти исключительно печеночный метаболизм препарата;
3. простота выполнения;
4. возможность проведения изотопного анализа как в режиме он-лайн, так и спустя практически неограниченное время после забора проб;
5. показатели теста демонстрируют хорошую корреляцию с показателями степени цирроза печени по шкале Чайльд-Пью;
6. тест даёт дополнительную информацию при решении вопроса о необходимости и срочности проведения операций на печени;
7. тест позволяет оперативно оценивать состояние печени после трансплантации, динамику поведения печёночных трансплантатов.

Проведение дополнительных исследований с построением адекватной модели фармакокинетики препарата и привязкой результатов теста к параметрам этой модели может сделать дыхательный тест с использованием ^{13}C -метацетина реальным претендентом на внедрение в широкую медицинскую практику.

ЛИТЕРАТУРА

1. *W.W.Shreeve, J.D.Shoop, D.G.Ott, B.B.McInteer.* Test for alcoholic cirrhosis by conversion of ^{14}C - or ^{13}C -galactose to expired CO_2 . *Gastroenterology*, vol.71, No.1, pp.98-101, 1976.
2. *C.S.Irving, D.A.Schoeller, K.Nakamura, A.L.Baker, P.D.Klein.* The aminopyrine breath test as a measure of liver function. *J. Lab.Clin.Med.*, vol.100, No.3, pp.356-368, 1982.
3. *A. Petrolati, D.Festi, G. De Berardinis, L. Colaiocco-Ferrante, D. Di Paolo, G. Tisone, M. Angelico.* ^{13}C -methacetin breath test for monitoring hepatic function in cirrhotic patients before and after liver transplantation. *Aliment Pharmacol Ther* 18(8): 785-790, 2003.
4. *В.Ю.Баранов, В.Г.Гришина, Н.С.Марченков, В.И.Невмержицкий, Е.Б.Свирицевский.* Изотопный тест дыхания – новые возможности для медицинской диагностики. Препринт ИАЭ-6185/14. Москва. 2000.
5. *R.J.Vonk, W.A.Coward, B.Geypens, T.Preston.* ^{13}C -octanoic acid breath test for monitoring gastric emptying. In *Stable Isotopes in Gastroenterology and Nutrition*, 2003.
6. *M. Paul and G. Wagner.* The ^{13}C -methacetin breath test (13CMBT) to assess hepatic microsomal function and disease severity. *Wagner Analysen Technik GmbH*. www.wagner-bremen.de.
7. *D.Festi, S.Capodicasa, L.Sandri, L.Colaiocco-Ferrante, T.Staniscia, E.Vitacolonna, A.Vestito, P.Simoni, G.Mazzella, P.Portincasa, E.Roda, A.Colecchia.* Measurement of hepatic functional mass by means of ^{13}C -methacetin and ^{13}C -phenylalanine breath tests in chronic liver disease: Comparison with Child-Pugh score and serum bile acid levels. *World J. Gastroenterology*, vol.11, No.1, pp.142-148, 2005.
8. *T.U.Cohnert, H.G.Rau, E.Buttler, T.Hernandez-Richter, G.Sauter, C.Reuter, F.W.Schildberg.* Preoperative risk assessment of hepatic resection for malignant disease. *World J. Surg.* 21, 396-401, 1997.

Для ссылок:

В.Г. Гришина, В.И.Невмержицкий, С.А.Сенченков, М.С. Новрузбеков, А.В.Чжао. Исследование метаболической функции печени углеродным изотопным дыхательным тестом. Сборник докладов 11-й международной научной конференции «Физико-химические процессы при селекции атомов и молекул и в лазерных, плазменных и нанотехнологиях» 11-15 декабря 2006. Звенигород.