

**Alicja Wiercińska-Drapała, Eugeniusz Tarasów, *Tadeusz Wojciech Łapiński*

SPEKTROSKOPIA PROTONOWA WĄTROBY U CHORYCH Z WZW TYPU C ORAZ Z KOINFEKCJĄ HIV/HCV

Zakład Radiologii, Akademii Medycznej w Białymstoku

Kierownik: Jerzy Walecki

*Klinika Obserwacyjno-Zakaźna, Akademii Medycznej w Białymstoku

Kierownik: Danuta Prokopowicz

Wykonano spektroskopię protonową rezonansu magnetycznego wśród chorych z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C i z koinfekcją HCV/HIV. Wykazano przydatność badania w ocenie zmian morfologicznych i zaburzeń metaboliczno-energetycznych wątroby.

Słowa kluczowe: wzw typu C, spektroskopia protonowa

Key words: hepatitis C, proton magnetic resonance spectroscopy

WSTĘP

Dokładna ocena stopnia uszkodzenia wątroby wśród chorych z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C (PWZW C) oraz przewlekłym zakażeniem HCV i HIV wymaga zastosowania szeregu testów biochemicznych, metod obrazowych i morfologicznej oceny narządu. Wycinek tkanki wątrobowej, niezbędny do oceny morfologicznej, uzyskuje się wykonując biopsję wątroby. Badanie to jest inwazyjne, a uzyskany fragment narządu nie zawsze pozwala na ustalenie jednoznacznej diagnozy.

Możliwość nieinwazyjnej oceny składu metabolicznego narządów i tkanek, jaką daje spektroskopia protonowa rezonansu magnetycznego (^1H MRS), stwarza perspektywę zastosowania tej metody u chorych z mięszszowymi schorzeniami wątroby. Badanie to pozwala na lepsze poznanie i zrozumienie nie tylko charakteru zmian morfologicznych, ale i ocenę zaburzeń metaboliczno-energetycznych.

Celem badań było określenie przydatności ^1H MRS do:

- 1) oceny zmian metabolicznych w wątrobie, ze szczególnym uwzględnieniem gospodarki lipidowej wśród chorych z PWZW C i zakażonych HCV/HIV;
- 2) określenia zależności pomiędzy poziomami metabolitów ocenianych w badaniach ^1H MRS i obrazem histologicznym oraz parametrami biochemicznymi wydolności wątroby;
- 3) oceny wpływu leczenia antyretrowirusowego na stopień uszkodzenia wątroby u chorych z zakażeniem HCV/HIV.

MATERIAŁ I METODY

Materiał. Badania przeprowadzono u 14 chorych z PWZW C oraz 20 chorych z koinfekcją HIV/HCV. Przybliżony czas trwania zakażenia w grupie chorych z PWZW C wyniósł $9,7 \pm 6,5$ roku, natomiast u chorych zakażonych HIV/HCV $10,4 \pm 7,3$ roku ($p < 0,05$).

Dziewięciu chorych z grupy HCV/HIV otrzymywało leczenie HAART składające się z dwóch nukleozydowych inhibitorów transkryptazy i co najmniej jednego nie-nukleozydowego inhibitora transkryptazy lub inhibitora proteazy. Średni czas leczenia w tej podgrupie chorych wyniósł 23 miesiące (5-41 miesięcy). Dodatkowo, grupę chorych z koinfekcją HCV/HIV podzielono na 2 podgrupy, w zależności od obecności (LD+) lub braku (LD-) objawów lipodystrofii. Do grupy chorych LD+ włączono pacjentów z zanikiem podskórnej tkanki tłuszczowej oraz zwiększeniem ilości tkanki tłuszczowej wisceralnej.

Metody. Do badań zakwalifikowano chorych u których uzyskano pozytywne wyniki testów serologicznych w kierunku zakażenia wirusem HCV. U wszystkich badanych oceniano poziom bilirubiny, aktywność transferazy alaninowej i asparaginianowej, stężenie triglicerydów oraz cholesterolu całkowitego w surowicy krwi. U chorych z grupy HCV/HIV oceniano liczbę CD3, CD4 i CD8 oraz liczbę kopii wirusa HIV w surowicy.

Spektroskopia protonowa wątroby. W obserwowanej grupie przeprowadzono badania spektroskopii protonowej wątroby z użyciem systemu Picker, Eclipse 1,5 T. Badania wykonywano z użyciem cewki całego ciała, z zastosowaniem sekwencji PRESS 35 (TE 35 ms, TR 1500 ms, nex 192). Tłumienia wody dokonywano metodą MOIST. Voxel o wielkości $3 \times 3 \times 3$ cm (27 cm^3) lokalizowano w obrębie prawego płata wątroby na podstawie obrazów T_2 – zależnych w płaszczyznach czołowych i poprzecznych. W miarę możliwości voxel lokalizowano tak, by nie obejmował dużych naczyń i dróg żółciowych. Dodatkowo, u 5 osób wykonano badania z obszarów dwóch różnych voxelów. Badania spektroskopowe wykonywano na czczo.

Otrzymane widma poddawano obróbce automatycznej z zastosowaniem tablicy przesunięć chemicznych, opracowanej na podstawie dostępnego piśmiennictwa (1), a następnie ręcznej obróbce obejmującej korekcję fazy, linii podstawowej i ostateczne dopasowanie krzywej. Na podstawie otrzymanych widm oceniano zawartość poszczególnych metabolitów, w jednostkach względnych, wykorzystując obliczenia dokonywane wg wzoru: pole powierzchni metabolitu $\times 1000$ /pole powierzchni nietłumionej wody.

Obliczano także proporcje poszczególnych metabolitów w odniesieniu do całkowitej zawartości lipidów (glikogenu/glukozy-Glu/TL, glutaminy/glutaminianów-Glx/TL oraz fosfomonoestrów-PME/TL).

Grupę kontrolną stanowiło 21 zdrowych ochotników 16 mężczyzn i 4 kobiety, z prawidłowymi wynikami testów czynnościowych wątroby (bilirubina, AST, ALT). Średnia wieku w grupie kontrolnej wynosiła $47,2 \pm 4,8$ lat i nie różniła się istotnie statystycznie od średniej wieku grupy badanej ($p < 0,05$).

Analiza statystyczna. Wyniki przedstawiono w postaci średnich arytmetycznych \pm odchylenie standardowe (SD). Analizy statystycznej dokonywano w oparciu o test U Mann'a-Whitney'a oraz analizy współczynnika korelacji. Wartości $p < 0,05$ przyjmowano za istotne statystycznie.

WYNIKI

U wszystkich badanych otrzymano dobre jakościowo widma ^1H MR pozwalające na ocenę poziomu poszczególnych metabolitów. Proporcje metabolitów w odniesieniu do całkowitego poziomu lipidów wynosiły: $0,014 \pm 0,005$ -Glu/TL, $0,017 \pm 0,005$ -Glx/TL oraz $0,024 \pm 0,006$ -PME/TL. W grupie chorych z PWZW C obserwowano ponad 6-krotny wzrost proporcji PME/TL ($0,112$; $p=0,001$) oraz 2-krotny wzrost Glx/TL ($0,042$; $p=0,02$) w odniesieniu do grupy kontrolnej.

W grupie z koinfekcją HCV/HIV obserwowano istotny statystycznie wzrost wszystkich proporcji metabolitów w porównaniu z grupą kontrolną (Glu/TL-328%, Glx/TL -458%, PME/TL 728%). Ponadto stosunki Glx/TL i PME/TL były istotnie statystycznie wyższe niż w grupie chorych z przewlekłym zapaleniem wątroby (odpowiednio $0,078$ v. $0,042$, $p=0,006$ i $0,173$ v. $0,122$, $p=0,004$) (tab. I).

Tabela I. Zawartość i proporcje metabolitów w badanych grupach w spektroskopii ^1H MR
Table I. Concentration and proportion of metabolites in examined groups in ^1H MR

Metabolity/ proporcje	Grupa kontrolna (n=21)	HCV (n=14)	P*	HIV/HCV (n=20)	p*	p [†]
Glu	$0,42 \pm 0,11$	$0,23 \pm 0,05$	NS	$0,72 \pm 0,3$	NS	NS
Glx	$0,76 \pm 0,18$	$1,11 \pm 0,23$	NS	$0,76 \pm 0,23$	NS	NS
PME	$1,33 \pm 0,24$	$1,82 \pm 0,25$	<0,05	$2,02 \pm 0,28$	NS	NS
TL	$74,1 \pm 12,2$	$43,2 \pm 9,4$	NS	$20,7 \pm 5,6$	<0,001	<0,05
Glu/TL	$0,014 \pm 0,005$	$0,013 \pm 0,003$	NS	$0,046 \pm 0,012$	0,002	NS
Glx/TL	$0,017 \pm 0,005$	$0,042 \pm 0,007$	0,006	$0,078 \pm 0,02$	0,02	0,006
PE/TL	$0,024 \pm 0,006$	$0,112 \pm 0,031$	0,004	$0,173 \pm 0,033$	<0,001	0,004

wartości podano jako średnie \pm SEM; * $P < 0,05$

* p – w odniesieniu do grupy kontrolnej, test U Mann-Whitney'a

† p – pomiędzy grupami HCV oraz HIV/HCV, co-infection group, test U Mann-Whitney'a

Zmiany proporcji metabolitów w badanych grupach chorych wynikały zarówno ze wzrostu zawartości poszczególnych metabolitów, jak i z obniżenia poziomu lipidów. W grupie chorych z PWZW C obserwowano istotne statystycznie zmniejszenie poziomu TL w porównaniu do grupy kontrolnej ($43,2 \pm 9,4$ v. $74,1 \pm 12,2$; $p=0,09$). U chorych z koinfekcją HCV/HIV poziom TL był obniżony w jeszcze większym stopniu ($20,7 \pm 5,6$; $p < 0,05$).

Poziomy poszczególnych metabolitów i ich proporcje w odniesieniu do TL w podgrupach chorych z koinfekcją HCV/HIV, otrzymujących leczenie HAART i nieleczonych nie różniły się istotnie, jednak w grupie HAART+ stwierdzano zwiększenie poziomów PME ($2,4 \pm 0,38$ vs $1,4 \pm 0,32$; $p=0,1$) i TL w porównaniu do grupy chorych nieleczonych ($28,1 \pm 10,1$ v. $13,4 \pm 4,1$; $p=0,07$) (tab. II).

Analizując zawartość i proporcje metabolitów w zależności od obecności lipodystrofii, stwierdzono, że u chorych LD+ dochodzi do wzrostu zawartości PME ($3,1 \pm 0,36$

Tabela II. Zawartość i proporcje metabolitów w badanych grupach w spektroskopii ^1H MR
 Table II. Concentration and proportion of metabolites in examined groups in ^1H MR

Metabolity/ proporcje	HIV/HCV (n=20)	HAART+ (n=9)	HAART- (n=11)	† p	LD+ (n=)	LD- (n=)	† p
Glu	0,72±0,3	1,03±0,44	0,49±0,13	NS	1,18±0,65	0,62±0,23	NS
Glx	0,76±0,23	1,2±0,6	0,24±0,08	<0,05	0,29±0,14	0,86±0,4	NS
PME	2,02±0,28	2,4±0,38	1,4±0,33	NS	3,1±0,36	1,5±0,2	<0,01
TL	20,7±5,6	28,1±10,1	13,4±4,1	<0,05	48,2±19,1	14,9±4,4	<0,05
Glu/TL	0,046±0,012	0,055±0,02	0,036±0,014	NS	0,006±0,001	0,05±0,14	0,05
Glx/TL	0,078±0,02	0,1±0,05	0,053±0,018	NS	0,096±0,08	0,072±0,02	NS
PE/TL	0,173±0,033	0,182±0,05	0,16±0,29	NS	0,168±0,09	0,175±0,02	NS

† p – pomiędzy grupami HAART+ /HAART- oraz LD+/LD-

v. 1,5±0,2; p=0,006) i TL (48,2±19,1 v. 14,9±4,4; p=0,04) w odniesieniu do grupy bez objawów lipodystrofii.

Ponadto w grupie chorych z koinfekcją HCV/HIV wykazano istotne statystycznie korelacje pomiędzy proporcjami metabolitów oraz liczbą CD8 ($r=0,62$, $p=0,02$; $r=0,68$, $p=0,02$, $r=0,64$, $p=0,04$ dla Glu/TL, Glx/TL i PME/TL), nie stwierdzano natomiast takich zależności pomiędzy proporcjami metabolitów a innymi parametrami: liczbą CD3, CD4, liczbą kopii wirusa i parametrami czynnościowymi wątroby.

DYSKUSJA

W widmach ^1H MR wątroby stwierdza się obecność pasm związków lipidowych, fosfomonoestrów, glikogenu/glukozy oraz glutaminy/glutaminianów. Szczególne znaczenie wśród tych metabolitów przypisywane jest fosfomonoestrom, ze względu na ich powiązanie z przemianami fosfolipidów błonowych (5). W obserwowanej grupie chorych stwierdzaliśmy istotny statystycznie, progresywny wzrost zawartości PME w odniesieniu do sygnału nietłumionej wody u chorych zakażonych HIV oraz w grupie z koinfekcją HCV. Wzrost zawartości PME wśród chorych z PWZW B i C stwierdzali *Cho* i wsp. w badaniach z zastosowaniem spektroskopii protonowej (3).

Dodatkowych dowodów na to, iż w przebiegu schorzeń wątroby dochodzi do zmian w przemianie fosfolipidów dostarczają badania spektroskopii fosforowej (^{31}P MRS). W badaniach tych stwierdzano znaczne odwrotne korelacje pomiędzy poziomami fosfomonoestrów (PME) i fosfodwuestrów (PDE), uważa się zatem, że ich wzajemne proporcje są ściśle powiązane z przemianami fosfolipidów błonowych (5,9).

Niewątpliwą zaletą zastosowania ^1H MR do badań wątroby jest możliwość ilościowej oceny *in vivo* zawartości związków lipidowych. *Longo* i wsp. (7,8) wykazali istotne zależności pomiędzy histologicznym stopniem stłuszczenia, a zawartością lipidów ocenianą na podstawie badań ^1H MR.

W badaniach własnych obserwowano znamienne obniżenie zawartości związków lipidowych u chorych z PWZW C w odniesieniu do grupy kontrolnej oraz dalsze obniżenie zawartości związków lipidowych w grupie HCV/HIV.

Wytlumaczeniem zmniejszania się zawartości lipidów może być zmniejszanie się ilości prawidłowego mięszu wątroby i rozwój zmian włóknistych. Potwierdzają to wyniki *Cho* i wsp., którzy u chorych z różnymi stopniami przewlekłego zapalenia wątroby obserwowali ścisłe zależności pomiędzy proporcjami metabolitów (glutaminy/glutaminianów, fosfomonoestrów oraz glikogenu/glukozy w odniesieniu do poziomu lipidów) w badaniach ^1H MR i nasileniem zmian włóknistych według skali Ludwiga ocenianych w badaniach histopatologicznych (3).

Wyniki badań ^1H MR potwierdzają wcześniejsze doniesienia, iż współistnienie zakażenia wirusami HIV i HCV przyspiesza przebieg przewlekłego zapalenia wątroby i powoduje wcześniejsze wystąpienie marskości wątroby (4,11).

Przebieg przewlekłego zapalenia wątroby u chorych z koinfekcją HIV/HCV zależy od statusu odpornościowego. Stwierdzono, że wysoki poziom HCV-RNA, nasilenie zmian włóknistych, rozwój marskości oraz śmiertelność związana z marskością jest związana z niskim poziomem CD4 (4,10). W badaniach własnych nie stwierdzano zależności pomiędzy poziomami metabolitów w widmach ^1H MR i liczbą CD4, obserwowaliśmy natomiast istotną korelację pomiędzy poziomami metabolitów i liczbą CD8.

Dodatkowym czynnikiem niekorzystnie wpływającym na czynność wątroby jest hepatotoksyczne działanie leków z grupy inhibitorów proteaz oraz analogów nukleozydów (2,6). W badanej grupie chorych stwierdzano, że zawartość lipidów u chorych otrzymujących leczenie HAART jest istotnie większa niż w grupie chorych nieleczonych, obserwowano również trend w kierunku wzrostu zawartości PME w tej grupie chorych.

Wzrost zawartości lipidów w wątrobie zakażonych HIV z lipodystrofią, leczonych HAART wykazali *J Sutinen* i wsp. na podstawie badań ^1H MRS (12).

WNIOSKI

1. Spektroskopia protonowa wątroby jest czułą metodą diagnostyczną w schorzeniach mięszszowych wątroby i może stanowić uzupełnienie badania histopatologicznego.

2. Zawartość metabolitów wątroby w badaniu ^1H MRS u chorych z PWZW C jest zmienna, zależna od wpływu czynników metabolicznych, organizmu zakażonego oraz stopnia zaawansowania zmian morfologicznych.

3. Współistnienie zakażenia wirusami HIV i HCV nasila stopień uszkodzenia wątroby i przyspiesza przebieg procesów zapalnych. Stosowane leczenie antyretrowirusowe u chorych zakażonych HCV/HIV niekorzystnie wpływa na metabolizm wątroby oraz nasila uszkodzenie hepatocytów.

A Wiercińska-Drapała, E Tarasów, TW Łapiński

PROTON MAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPY IN THE LIVER
OF HIV AND HCV COINFECTED PATIENTS

SUMMARY

The ^1H MR spectroscopy (^1H MRS) creates possibility of non-invasive study of morphological changes ^1H MRS and metabolic disturbance of the liver. The aim of study was estimated of ^1H MRS in investigation of liver metabolic changes, with special regard of lipids in patients with HCV and HIV/HCV infection.

Material and methods. Research was moved among patients with HCV infection and in HCV/HIV co infection. ^1H MRS of the liver was moved with use of system Picker, Eclipse 1.5 T. Investigation were executed with use of tube of whole body, with use of sequence PRESS 35 (TE 35 ms, TR 1500 ms, nex 192). Suppression of water was made of MOIST method. Voxel about sizes $3 \times 3 \times 3$ (27 cm^3) were located in right piece of liver on basis of paintings T_2 - dependence in front and transverse planes.

Result. In group of HCV patients without HIV infection were observed over 6 x increase proportion of PME/TL (0.112; $p=0.001$) and 2 x increase of Glx/TL (0.042; $p=0.02$) in refer to control group. In patients with HCV and HIV infection were observed significance increase of Glu/TL – 328%, Glx/TL – 458% and PME/TL 728% in comparison to control group. The patients with only HCV infection were statistical significance decrease of TL level in comparison to control group (43.2 ± 9.4 v. 74.1 ± 12.2 ; $p=0.09$). The patients with HCV and HIV infection, level of TL was lowered in refer patients with only HCV infection (20.7 ± 5.6 ; $p<0.05$).

Conclusions. Proton magnetic resonance spectroscopy of the liver is useful diagnostic method in detecting of parenchyma liver damage and to make up supplement of histology diagnosis.

PIŚMIENNICTWO

1. Bell JD, Cox IJ, Sargentoni J, i in. A ^31P and ^1H -NMR investigation in vitro of normal and abnormal human liver. *Biochim Biophys Acta* 1993;1225:71-7.
2. Bienvu L, Burel F, Hofman V, i in. A rare etiology of hepatic steatosis associated with lactic acidosis: the toxicity of antiviral nucleoside analogues. *Ann Pathol* 2001;21:160-3.
3. Cho SG, Kim MY, Kim HJ, i in. Chronic hepatitis: in vivo proton MR spectroscopic evaluation of the liver and correlation with histopathologic findings. *Radiology* 2001;221:740-6.
4. Di Martino V, Rufat P, Boyer N, i in. The influence of human immunodeficiency virus coinfection on chronic hepatitis C in injection drug users: a long-term retrospective cohort study. *Hepatology* 2001;34:1193-9.
5. Farghali H, Rilo H, Zhang W, i in. Liver regeneration after partial hepatectomy in the rat. Sequential events monitored by ^31P -nuclear magnetic resonance spectroscopy and biochemical studies. *Lab Invest* 1994;70:418-425.
6. Lenhard JM, Croom DK, Weiel JE, i in. HIV protease inhibitors stimulate hepatic triglyceride synthesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2625-9.
7. Longo R, Ricci C, Masutti F, i in. Fatty infiltration of the liver Quantification by ^1H localized magnetic resonance spectroscopy and comparison with computed tomography. *Invest Radiol* 1993;28:297-302.
8. Longo R, Polesello P, Ricci C, i in. Proton MR spectroscopy in quantitative in vivo determination of fat content in human liver steatosis. *J Magn Reson Imaging* 1995;5:281-5.
9. Mann DV, Lam WWM, Hjelm NM, i in. Human liver regeneration; hepatic energy economy is less efficient when the organ is diseased. *Hepatology* 2001;34:557-65.

10. Puoti M, Bonacini M, Spinetti A, i in. HIV-HCV Coinfection Study Group: Liver fibrosis progression is related to CD4 cell depletion in patients coinfecting with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 2001;183:134-7.
11. Serfaty L, Costagliola D, Wendum D, i in. Impact of early-untreated HIV infection on chronic hepatitis C in intravenous drug users: a case-control study. *AIDS* 2001;15:2011-6.
12. Sutinen J, Hakkinen AM, Westerbacka J, i in. Increased fat accumulation in the liver in HIV-infected patients with antiretroviral therapy-associated lipodystrophy. *AIDS* 2002;16:2183-93.

Adres autora:

dr n med. Tadeusz W. Łapiński
Klinika Obserwacyjno-Zakaźna Akademii Medycznej w Białymstoku
ul. Żurawia 14, 15-540 Białystok
tel. (85) 741 69 21
e-mail: twlapinski@wp.pl