

**ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ЭЛЕКТРОННОГО ПАРАМАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА  
ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЖЕЛЧНЫХ КАМНЕЙ**

С. А. Киселев<sup>1\*</sup>, Л. В. Цыро<sup>1</sup>, Д. А. Афанасьев<sup>1</sup>,  
Ф. Г. Унгер<sup>1</sup>, М. М. Соловьев<sup>2</sup>

УДК 544.175+616.366-003.7

<sup>1</sup> Национальный исследовательский Томский государственный университет, Россия,  
634050, Томск, просп. Ленина, 36; e-mail: stanislav.kiselev.89@mail.ru

<sup>2</sup> Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

(Поступила 26 июня 2013)

Представлены результаты исследования смешанных холестериновых желчных камней методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Установлено, что свободные радикалы в объеме камня распределены неравномерно. Тип и количество парамагнитных центров зависят от содержания пигмента в выделенном слое. Показано, что параметры линий секстета в ЭПР-спектре пигмента близки к параметрам линий спектра бурого пигментного камня.

**Ключевые слова:** электронный парамагнитный резонанс, свободные радикалы, смешанные желчные камни, холестериновые желчные камни, билирубин.

Results are presented of a study of mixed cholesterol gallstones by electron paramagnetic resonance (EPR). It is found that free radicals are distributed irregularly within the stones. The type and amount of paramagnetic centers depend on the amount of pigment in the selected layer. It is shown that parameters of sextet lines in the pigment EPR spectrum are similar to parameters of the lines in a spectrum of brown pigment stones.

**Keywords:** electron paramagnetic resonance, free radicals, mixed gallstones, cholesterol gallstones, bilirubin.

**Введение.** Свободные радикалы — это атомы, молекулы или фрагменты молекул, содержащие один или несколько неспаренных электронов, т. е. системы, в которых одна или несколько спин-орбиталей заселены единственным электроном [1]. В живых организмах свободные радикалы выполняют функцию посредника во многих физиологических процессах и служат для защиты клетки от оксидативного стресса и для поддержания окислительно-восстановительного равновесия. В организме человека содержание свободных радикалов постоянно контролируется и определяется скоростями образования и выведения их из организма. Повышенное содержание свободных радикалов свидетельствует о протекании таких процессов, как старение, воспаление, развитие опухоли, образование атеросклеротических бляшек и др. [2—5]. Свободные радикалы инициируют и участвуют в цепи радикальных превращений, приводящих к повреждению, мутации и гибели клеток [2].

Существуют способы защиты от вредоносного действия свободных радикалов, в основе которых лежит использование антиоксидантов. Последние могут производиться внутри организма или поступать извне вместе с пищей. Одной из молекул, обладающих антиокислительными свойствами, является билирубин. Этот продукт распада гема млекопитающих прерывает цепь радикальных превращений и переходит в радикальную форму [6—8]. Попадая в желчный пузырь и желчные протоки, он принимает участие в образовании желчных камней (ЖК). Радикал билирубина склонен к полимеризации и агрегации, а также способен вызывать повреждения гепатоцитов, что снижает клеточную функцию и приводит к сбою метаболизма и, как следствие, образованию ЖК [9].

Показано [10], что ЭПР-сигнал пигментных ЖК зависит от содержания билирубина. На сегодняшний день проведено множество исследований, связанных с изучением парамагнитной (радикальной) состав-

**ELECTRON PARAMAGNETIC RESONANCE APPLICATION TO STUDY GALLSTONES**

S. A. Kiselev<sup>1\*</sup>, L. V. Tsyro<sup>1</sup>, D. A. Afanasiev<sup>1</sup>, F. G. Unger<sup>1</sup>, and M. M. Soloviev<sup>2</sup> (<sup>1</sup> National Research Tomsk State University, 36 Lenin Prosp., Tomsk, 634050, Russia; e-mail: stanislav.kiselev.89@mail.ru; <sup>2</sup> Siberian State Medical University, Tomsk, Russia)

ляющей ЖК. Несмотря на большой интерес к этой проблеме, многое в процессах формирования ЖК остается до конца не ясным, а существующие гипотезы являются дискуссионными. Это связано с разнообразным элементным составом и сложным фазовым составом ЖК, включающим в себя как минеральную, так и органическую составляющие, которые очень трудно разделить. По данным клинических наблюдений, желчнокаменная болезнь (ЖКБ) считается едва ли не самой распространенной болезнью пищеварительной системы, уступая лишь язвенной болезни. Данное заболевание зависит от действия многих факторов, характеризуется образованием камней в желчевыводящих путях, сопровождается повреждением печени, почек и желудочно-кишечного тракта [11, 12]. Существуют успешные способы лечения ЖКБ, однако все же лучше ее предотвращение, поэтому важным остается понимание процесса формирования ЖК.

Совместно с кафедрой госпитальной хирургии Сибирского государственного медицинского университета нами проведено исследование серии холестериновых ЖК, полученных в результате лапароскопической операции по удалению желчного пузыря. Операции проводились по медицинским показаниям у женщин 30—45 лет, страдающих ЖКБ, осложненной хроническим холециститом. Срок существования ЖК у пациенток, по данным ранее проводимых ультразвуковых исследований, составил от трех до пяти лет. Исследование удаленных ЖК проводилось с согласия пациенток. Для сохранения химического состава конкрементов забор их осуществлялся непосредственно после операции в стерильных условиях. Транспортировка ЖК осуществлялась в желчи, полученной из удаленного желчного пузыря.

**Эксперимент. Образцы.** Для послойного анализа из общей серии холестериновых ЖК отобрано пять образцов. Все ЖК имели отчетливо различимую по окраске слоистую структуру. Практически все образцы ЖК оказалось возможным разделить с помощью скальпеля на три слоя, которые для удобства условно обозначим 1, 2 и 3, начиная нумерацию от центра камня. Для более детального исследования четыре образца растворяли в бензоле. При этом получали раствор и нерастворимый осадок, который отделяли от раствора. Осадок, цвет которого у разных ЖК от коричневого до черного, обозначим как пигмент. Из оставшегося раствора путем выпаривания получали остаток, имеющий окраску от белой до светло-бежевой, основным компонентом которого является холестерин. Назовем эту часть ЖК холестериновой [13].

**Оборудование.** ЭПР-спектры ЖК получены на спектрометре JEOL JES-FA200,  $T = 298$  К, частота СВЧ излучения  $\sim 9.4$  ГГц, частота модуляции 100 кГц, чувствительность  $7 \cdot 10^9$  спин/0.1 мТл, максимальная развертка магнитного поля 500 мТл, ширина модуляции 1 мТл. Время развертки поля 4 мин. Образец помещался в кварцевую ампулу с внутренним диаметром 3 мм.

Количество парамагнитных центров (ПЦ) в образце рассчитывали по формуле

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

где  $C_{\text{ПЦ}}$  и  $C_{\text{ПЦ}}^*$  — количество ПЦ в образце и эталоне;  $S_{\text{ПЦ}}$  и  $S_{\text{ПЦ}}^*$  — площадь под интегральной кривой для образца и эталона в пределах 150—450 мТл;  $m$  — масса исследуемого образца.

Эталоном являлась сажа, полученная из сахарозы путем нагревания до  $650$  °С в инертной атмосфере.

**Результаты и их обсуждение.** ЭПР-спектры слоев одного из ЖК приведены на рис. 1. Можно выделить узкую линию (синглет); сигнал, состоящий из шести линий (секстет); широкую линию. Синглет ( $g = 2.0032$ ) соответствует радикалу билирубина, относительная интенсивность этой полосы уменьшается при переходе от слоя 1 к 3. Секстет, отчетливо проявляющийся во внешнем слое 3, соответствует радикалу с ядерным спином 5/2, которым, согласно [14], является  $\text{Mn}^{2+}$ . Широкая линия, однозначная характеристика которой затруднена, более выражена в слое 1. Вероятно, это сигнал  $\text{Cu}^{2+}$ , имеющий  $g_{\perp} = 2.05$  и  $g_{\parallel} = 2.20$  [15]. Таким образом, ЭПР-спектры слоев, полученных разделением ЖК, имеют одинаковый набор линий, образующих сложную структуру.

Каждый слой характеризуется своим содержанием ПЦ. Повышенное количество ПЦ отмечается в слоях с большим содержанием пигмента. Несмотря на то что для некоторых ЖК, например образцы Ж2 и Ж5 (табл. 1), характерно приблизительно одинаковое послойное содержание ПЦ в пределах сформированного камня, в каждом из этих слоев преобладают радикалы различных типов. Определенной закономер-

**Т а б л и ц а 1.** Послойное содержание (спин/г) парамагнитных центров в желчных камнях

Образец	Слой		
	1	2	3
Ж1	малое количество	$3.4 \cdot 10^{18}$	$3.9 \cdot 10^{19}$
Ж2	$2.2 \cdot 10^{19}$	$2.7 \cdot 10^{19}$	$2.1 \cdot 10^{19}$
Ж3	$2.8 \cdot 10^{19}$	$6.1 \cdot 10^{18}$	$7.0 \cdot 10^{18}$
Ж4	$1.7 \cdot 10^{19}$	$7.7 \cdot 10^{17}$	$4.0 \cdot 10^{19}$
Ж5	$1.7 \cdot 10^{18}$	$7.0 \cdot 10^{18}$	$3.3 \cdot 10^{18}$

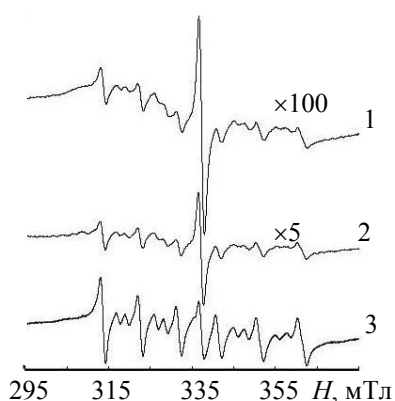


Рис. 1. ЭПР-спектры слоев 1—3 образца Ж4

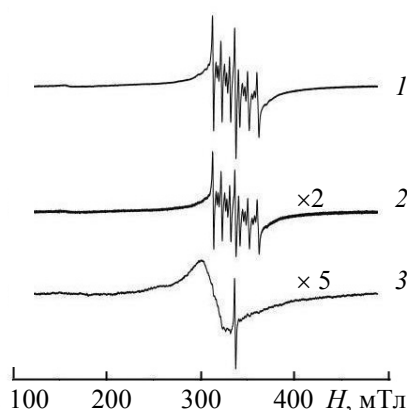


Рис. 2. ЭПР-спектры образца Ж4: 1, 2 — пигментная часть; 3 — холестеринная часть

ности распределения ПЦ в выделенных слоях не прослеживается. Полученные данные свидетельствуют об изменениях в составе желчи за период образования каждого слоя. Конечно, такая оценка является достаточно грубым приближением, поскольку следует учитывать, что послойные отложения в процессе роста ЖК могут быть намного меньше выделенных слоев. К тому же выделенные слои содержат разное количество пигмента, отложение которого может быть последовательным или носить случайный характер [16, 17]. Тем не менее это подтверждает, что образование ЖК происходит в течение времени, за которое состав желчи претерпевает изменения. Наличие ПЦ в каждом из выделенных слоев в определенной мере характеризует протекание радикальных процессов в желчном пузыре и организме в целом в период формирования каждого из слоев [18].

Очевидно, что количество пигмента, входящего в состав слоя, будет влиять как на ЭПР-спектр, так и на количество ПЦ. Это подтверждается тем, что в состав пигментных и холестеринных частей входят разные типы ПЦ [14], что наглядно видно из ЭПР-спектров холестеринной и пигментной частей ЖК (рис. 2). В пигменте находится в ~10 раз больше ПЦ, чем в холестеринной части, несмотря на то что пигментная часть составляет в среднем всего 3.75 мас. % (табл. 2). Линия билирубина присутствует в спектре как холестеринной, так и пигментной части. Это связано с тем, что радикал билирубина может быть представлен и в свободном виде (растворимом), и в виде не растворимых в бензоле соединений: солей различных металлов или полимера [9, 19].

**Т а б л и ц а 2. Количество (спин/г) парамагнитных центров в пигментной и холестеринной частях желчных камней**

Образец	Пигментная часть	Холестеринная часть	Остаток, мас. %
Ж1	$7.0 \cdot 10^{20}$	$2.4 \cdot 10^{19}$	4.3
Ж4	$8.4 \cdot 10^{19}$	$1.2 \cdot 10^{19}$	3.7
Ж5	$4.4 \cdot 10^{19}$	$7.5 \cdot 10^{18}$	4.4
Ж6	$2.3 \cdot 10^{19}$	$7.6 \cdot 10^{18}$	2.6

Спектр холестеринной части содержит линии с  $g$ -фактором ~2.14 и ~2.56. В спектре пигментной части ЖК присутствуют секстет  $Mn^{2+}$ , а также слабая линия  $Fe^{3+}$  ( $g = 4.1935$ ). Аналогичные линии наблюдаются в спектре карбонатного камня (рис. 3) и полностью отсутствуют в спектрах холестеринной части всех исследованных камней.

Во всех образцах, включая карбонатный камень, шесть линий имеют одинаковое положение и близкую анизотропную константу сверхтонкого взаимодействия (табл. 3). Спектры всех камней сдвинуты в слабое поле по сравнению со стандартом  $Mn^{2+}$  в матрице  $MgO$ . Величина электронно-ядерного расщепления немного больше, чем в стандарте. При движении из слабого поля в сильное происходит уширение каждой последующей линии секстета — отношение ширины первой и шестой линий ~1.5. Вероятно, каждая линия секстета образована двумя линиями с близкой константой сверхтонкого взаимодействия. Это свидетельствует о наличии двух различных ПЦ с ядерным спином 5/2.

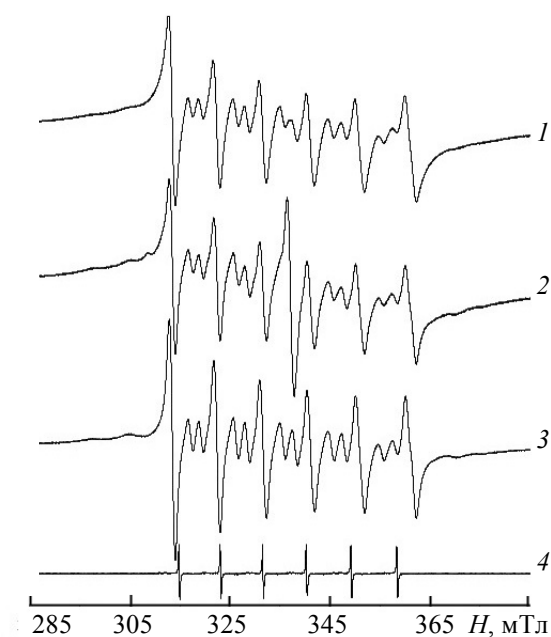


Рис. 3. ЭПР-спектры: 1 — пигментная часть образца Ж1; 2 — пигментная часть образца Ж4; 3 — карбонатный камень (черный пигментный камень); 4 — стандарт  $Mn^{**}$  в  $MgO$

Т а б л и ц а 3. Параметры линий 1—6 секстета в ЭПР-спектрах желчных камней

Образец	1		2		3		4		5		6	
	$g$	$\Delta H$	$g$	$\Delta H$	$g$	$\Delta H$	$g$	$\Delta H$	$g$	$\Delta H$	$g$	$\Delta H$
$Mn^{**}$ в $MgO$	1.9305	0.19	1.9209	0.20	1.9112	0.18	1.9014	0.18	1.8915	0.18	1.8813	0.20
Ж1	2.1535	1.24	2.0940	1.30	2.0361	1.34	1.9791	1.55	1.9253	1.85	1.8715	2.08
Ж4	2.1530	1.29	2.0938	1.26	2.0362	1.39	1.9787	1.50	1.9254	1.80	1.8729	1.99
Карбонатный камень	2.1536	1.39	2.0944	1.40	2.0365	1.43	1.9799	1.59	1.9258	1.95	1.8705	2.40

П р и м е ч а н и е.  $\Delta H$  — ширина линии, мТл;  $g$  — спектроскопический фактор.

В ЭПР-спектрах каждого из образцов пигментной части, а также карбонатного камня с обеих сторон от секстетной линии расположено по две линии примерно одинаковой интенсивности. Согласно [20], эти линии соответствуют центрам  $Mn^{**}$ , имеющим другое окружение (иными словами, обладающим другой электронной конфигурацией). Линии дублета, отделяющие компоненты секстета друг от друга, описаны как запрещенные переходы, соответствующие одновременному изменению магнитных электронного и ядерного чисел  $\Delta M = \pm 1$  и  $\Delta m = \pm 1$  [19].

**З а к л ю ч е н и е.** Представленные данные свидетельствуют о том, что желчные камни являются сложным объектом, формирующимся под действием многих факторов, влияющих на их состав и строение. Показано, что парамагнитные центры внутри желчных камней распределены неравномерно. Это свидетельствует о поэтапном формировании камня, обусловленном радикальными процессами, в которых участвуют разные типы и количество парамагнитных центров. ЭПР-спектр пигментной части камня достаточно сильно похож на ЭПР-спектр карбонатных камней. Пигментная часть характеризуется большим количеством парамагнитных центров, чем холестеринная. Поскольку известно [21—26], что свободные радикалы могут выступать в роли “центров” формирования ассоциативных комбинаций в нефтяных дисперсных системах, а также агрегировать в виде солей жесткости в водных системах, возможна аналогия действия подобного механизма при формировании желчного камня.

[1] Ф. Г. Унгер, Л. В. Цыро, Л. Н. Андреева, С. Я. Александрова, Д. А. Афанасьев, С. А. Киселев, Ф. Ф. Санников, А. Ф. Унгер, М. Ф. Унгер, А. К. Эфа. Наносистемы, дисперсные системы, квантовая механика, спиновая химия, Томск, ТМЛ-Пресс (2010) 205—249

- [2] **W. Droge.** *Phys. Rev.*, **82** (2002) 47—95
- [3] **T. W. Kensler, M. A. Trush.** *Environ. Mutagen.*, **6** (1984) 593—616
- [4] **P. A. Southorn, G. Powis.** *Cell Chem. Physiol.*, **4**, N 2 (1996) 357—371
- [5] **M. Martfnez-Cayuela.** *Biochim.*, **77** (1995) 147—161
- [6] **R. Stocker, A. F. McDonagh, A. N. Glazer, B. N. Ames.** *Method. Enzymol.*, **186** (1990) 301—309
- [7] **L. B. Dudnik, N. G. Khrapova.** *Membr. Cell Biol.*, **12**, N 2 (1998) 233—240
- [8] **R. Stocker, Y. Yamamoto, A. F. McDonagh, A. N. Glazer, B. N. Ames.** *Science*, **235** (1987) 1043—1045
- [9] **L. Xiang-Tao, H. Jian.** *World J. Gastroenterol.*, **8**, N 3 (2002) 413—417
- [10] **G. Elek, A. Rockenbauer.** *Klinisc. Wochenschrift*, **60** (1982) 33—35
- [11] **О. А. Голованова.** Биоминералогия мочевых, желчных, зубных и слюнных камней из организма человека, автореф. дис. ... д-ра геол.-минер. наук, Томск (2009)
- [12] **Э. И. Белобородова.** Избранные главы клинической гастроэнтерологии, ч. 2, Томск, НТЛ (2002) 50—65
- [13] **P. M. Bills, D. A. Lewis.** *Gut*, **16** (1975) 630—637
- [14] **E. N. Chikvaidze, T. V. Gogoladze, I. N. Kirikashvili, G. I. Mamniashvili.** *Georg. Med. News*, **168** (2009) 10—14
- [15] **W. Chua-Anusorn, T. G. St. Pierre, J. Webb, K. Wang, J. F. Lu.** *Hyperfine Interact.*, **91** (1994) 911—916
- [16] **P. F. Malet, C. E. Williamson, B. W. Trotman, R. D. Soloway.** *Hepatology*, **6**, N 3 (1986) 477—481
- [17] **D. J. Sutor, S. E. Wooley.** *Gut*, **15** (1974) 130—131
- [18] **J. Donald Ostrow.** *Hepatology*, **4**, N 5 (1984) 215—221
- [19] **M. Stefan, S. V. Nistor, J. N. Barascu.** *J. Magn. Res.*, **210** (2011) 200—209
- [20] **B. Bleaney, R. S. Rubins.** *Proc. Phys. Soc.*, **77** (1961) 103—112
- [21] **Л. Н. Андреева, С. Я. Александрова, Л. В. Цыро, Ф. Г. Унгер.** *Изв. вузов. Нефть и газ*, **4** (2009) 101—107
- [22] **Л. Н. Андреева, Л. В. Цыро, С. Я. Александрова, А. Ю. Потачкина, М. В. Тихонова, Ф. Г. Унгер.** *Изв. вузов. Нефть и газ*, **1** (2008) 63—69
- [23] **Л. Н. Андреева, С. Я. Александрова, Л. В. Цыро, Ф. Г. Унгер.** *Технол. топл.-энерг. комплекса*, **6** (2007) 74—79
- [24] **Л. Н. Андреева, Л. В. Цыро, С. Я. Александрова, Ф. Г. Унгер.** *Технол. топл.-энерг. комплекса*, **5** (2005) 98—103
- [25] **Л. В. Цыро, Л. Н. Андреева, С. Я. Александрова, Ф. Г. Унгер.** *Вода: химия и экология*, **4** (2011) 66—73
- [26] **Ф. Г. Унгер, Л. В. Цыро, М. В. Тихонова, С. Я. Александрова, Д. А. Афанасьев, А. Ф. Унгер, Л. Н. Андреева.** *Ползуновск. вестн.*, **3** (2009) 77—81