

УДК 616.1/4:613.81]:616.155.1-07-092

К ВОПРОСУ О ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ АЛКОГОЛЬНОЙ И НЕАЛКОГОЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ БОЛЕЗНИ ПЕЧЕНИ

¹Кручинина М.В., ¹Курилович С.А., ¹Громов А.А., ¹Головин М.Г.,
¹Чекалина Е.А., ²Генералов В.М., ²Генералов К.В., ²Сафатов А.С.,
²Буряк Г.А., ³Кручинин В.Н., ³Рыхлицкий С.В.

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины»,
Новосибирск, e-mail: kruchmargo@yandex.ru;

²ФБУН Государственный Научный Центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово;

³ФГБУ Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова СО РАН, Новосибирск

Исследованы возможности дифференциальной диагностики алкогольной и неалкогольной жировой болезни печени, основанные на исследовании электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов методом диэлектрофореза с помощью электрооптической системы детекции клеток. Выявлены наиболее значимые в плане диагностики жировой болезни печени различного генеза характеристики эритроцитов: средний диаметр эритроцита, амплитуда деформации при частоте 10⁶Гц, степень деформации при 0,5х10⁶Гц, обобщенные показатели вязкости и жесткости, поляризуемость при частоте 10⁶Гц, величина дипольного момента. Определены чувствительность (88,5%) и специфичность (92,9%) при использовании совокупности параметров эритроцитов в целях дифференциальной диагностики.

Ключевые слова: дифференциальная диагностика, алкогольная, неалкогольная жировая болезнь печени, диэлектрофорез, эритроциты

TO THE QUESTION OF DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF ALCOHOL AND NONALCOHOL FATTY LIVER DISEASE

¹Kruchinina M.V., ¹Kurilovich S.A., ¹Gromov A.A., ¹Golovin M.G.,
¹Chekalin E.A., ²Generalov V.M., ²Generalov K.V., ²Shaphatov A.S.,
²Buriak G.A., ³Kruchinin V.N., ³Ryhlytsky S.V.

¹Federal State Budgetary of Scientific Institution «Institution of Internal and Preventive Medicine»,
Novosibirsk, e-mail: kruchmargo@yandex.ru;

²The State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo;

³Rzhanov Institute of Semiconductor Physics SB RAS, Novosibirsk

The possibilities of differential diagnosis of alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease, based on a study of electric and viscoelastic parameters of red blood cells by dielectrophoresis using electro-optical detection system cells were investigated. The most significant characteristics of red blood cells in terms of diagnosis of fatty liver disease of various genesis were revealed: the average diameter of a red blood cell, the amplitude of erythrocyte deformation at a frequency of 10⁶ Hz, the degree of deformation at 0,5х10⁶Hz, generalized indicators of viscosity and rigidity, the polarizability at a frequency 10⁶Hz, the value of the dipole moment. The sensitivity (88.5%) and specificity (92.9%) using the set of parameters of red blood cells for differential diagnosis were determined.

Keywords: differential diagnosis, alcoholic, non-alcoholic fatty liver disease, dielectrophoresis, erythrocytes

Распространенность жировой болезни печени неуклонно возрастает во всем мире. В связи со сложностью разграничения этиологических факторов, приведших к данной патологии, и сходстве гистологических изменений в ткани печени в 2011 г. был предложен термин «метаболический синдром – ассоциированная жировая болезнь печени» [11]. В патогенезе алкогольной (АЖБП) и неалкогольной (НАЖБП) жировой болезни печени, в рамках метаболического синдрома прослеживается общность звеньев. Это, прежде всего, активация перекисного окисления липидов (ПОЛ), окислительный стресс, поражение фосфолипидов мембран митохондрий, нарушение системного и клеточного звеньев липидного обмена. Это объясняет

сложности в процессе дифференциальной диагностики, поскольку, как данные осмотра, анкетирования, биохимических, так и инструментальных методов исследования, включая биопсию печени, на уровне стеатоза печени дают сходные результаты, не позволяя достоверно высказаться об этиологии процесса [3, 6].

Тем не менее, информация о генезе жировой болезни печени является важной для определения тактики ведения пациента (включая необходимость наблюдения наркологом в случае АЖБП), акцентов в терапии, прогноза заболевания.

Гипотеза настоящего исследования состояла в том, что алкоголь и его метаболит – ацетальдегид являются универсальными

мембранотропными соединениями [9], поэтому подход, позволяющий выявить это токсическое действие на уровне мембран и клеток в целом, окажется полезным в плане дифференциальной диагностики жировой болезни печени алкогольного и неалкогольного генеза.

Накопленные в литературе данные свидетельствуют, что эритроцит является высокочувствительной клеткой к воздействию со стороны внешних и внутренних факторов, в ответ на которые наступают глубокие изменения, коренным образом трансформирующие электрические и вязкоупругие характеристики клетки в целом [7, 10]. Проведенными нами ранее исследования позволили сделать вывод, что исследование клеток красной крови методом диэлектрофореза [2] перспективно в отношении определения степени фиброза печени [5], этиологии процесса [4], тяжести заболевания, наличия осложнений [1].

Цель работы – оценить возможность метода диэлектрофореза эритроцитов в дифференциальной диагностике алкогольной и неалкогольной жировой болезни печени.

Материалы и методы исследования

Обследовано 80 пациентов с жировой болезнью печени различного генеза (средний возраст $56,2 \pm 1,1$ года), из них 42 женщины, 38 мужчин, которые были разделены на две группы в зависимости от этиологии стеатоза печени. Диагноз был верифицирован на основании клинического, биохимического и инструментальных исследований, включая ультразвуковое, непрямую эластометрию, а также анкеты по потреблению алкоголя, уровню тревоги, отношению к образу жизни. Первую группу составили 28 пациентов (35%) с наличием алкогольной жировой болезни печени (АЖБП), вторую группу – 52 больных (65%) с признаками неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП).

Критериями включения в исследование являлись: 1. наличие мужчин и женщин 25-70 лет с жировой болезнью печени или факторами ее риска (злоупотребляющих алкоголем, имеющих ИМТ или ожирение, нарушения липидного обмена, инсулинорезистентность и др.); 2. подписание информированного согласия на участие в исследовании.

Группу сравнения (третья группа) составили практически здоровые обследуемые (20 человек – 12 женщин, 8 мужчин, средний возраст $54,7 \pm 1,3$ года), ведущие здоровый образ жизни и употребляющие алкоголь не чаще 1-2-х раз в месяц в умеренных дозах, у которых при клиническом, лабораторном и инструментальном обследовании не выявлено признаков заболевания печени и другой патологии внутренних органов.

Обследование выполнено с одобрения Комитета Биомедицинской Этики ФГБНУ «НИИТПМ» (протокол от 28.02.2015). Все обследуемые заполняли стандартные анкеты: 1) информированное согласие пациента на участие в обследовании; 2) стандартную анкету о частоте и дозах потребляемого алкоголя – CAGE-опросник, AUDIT (для выявления алкогольного генеза стеатоза); 3) анкету по выявлению патологии желудочно-кишечного тракта; 4) анкету по образу жизни.

В условиях клиники НИИТПМ пациентам были выполнены следующие инструментальные исследования: УЗИ органов брюшной полости, ЭКГ, непрямая эластометрия печени (НЭМ), у части пациентов выполнена компьютерная томография.

Проведены исследования общего анализа крови, мочи, биохимического исследования крови с акцентом на печеночные пробы, показатели метаболического синдрома, исследование маркеров вирусных гепатитов.

Для проведения исследования эритроцитов методом диэлектрофореза в неоднородном переменном электрическом поле (НПЭП) клетки красной крови получали из цельной крови пациентов, взятой из вены. Подробно методика описана в монографии [2]. Для компьютерной обработки данных использовался пакет оригинальных программ CELLFIND. Ошибка воспроизводимости метода – 7-12%.

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 отклонения распределения от нормального использовались непараметрические критерии (U-критерий Манна-Уитни, Колмогорова-Смирнова, хи-квадрат). Связи между признаками оценивались путем вычисления коэффициента корреляции Спирмена (r). Во всех процедурах статистического анализа критический уровень значимости нулевой гипотезы (p) принимался равным 0,05. Для оценки значимости параметров эритроцитов с точки зрения дифференциальной диагностики алкогольной и неалкогольной жировой болезни печени был использован ROC-анализ с помощью построения приемных характеристических кривых (ROC-кривые) для различных характеристик клеток красной крови.

Результаты исследования и их обсуждение

При анализе особенностей проявлений жировой болезни печени (ЖБП) в общей группе (80 человек) были выявлены следующие аспекты. Минимальная биохимическая активность процесса отмечена у 38 человек, умеренная – у 42. Лабораторные признаки цитолиза выявлены у 43% больных ЖБП, уровень сывороточных трансаминаз не превышал трех норм, при этом содержание АЛТ превышало показатель АСТ. У 38% больных выявлено повышение активности щелочной фосфатазы (не более, чем двукратное) и гамма-глутамилтранспептидазы. Гипербилирубинемия (преимущественно смешанная) в пределах $1,5 N$ имела место в 32% случаев. Диспротеинемия различной степени выраженности выявлена у 18% пациентов. Стадия болезни определялась на основании клинических, биохимических и инструментальных исследований. Ультразвуковое исследование и компьютерная томография позволили верифицировать наличие гепато-

мегалии у всех пациентов, косвенно оценить степень фиброза печени у большинства обследуемых как умеренную (F2 ст.), признаки формирования портальной гипертензии отсутствовали. Вирусная этиология заболевания исключена на основании отсутствия серологических маркеров методом иммуноферментного анализа (ИФА) и (или) ДНК и РНК вирусов методом полимеразноцепной реакции (ПЦР). Алкогольный генез стеатоза устанавливался по данным достоверно подтвержденного отсутствия или наличия систематического потребления алкоголя в настоящее время и в анамнезе (по данным стандартного опроса, в том числе с помощью SAGE-опросника, AUDIT).

У 59 (73,8%) пациентов общей группы жировая болезнь печени представляла собой проявление метаболического синдрома. У 67,5% больных выявлено абдоминально-висцеральное ожирение с ИМТ > 30 кг/м². Артериальная гипертензия II степени обнаружена у всех обследованных. Сахарный диабет 2-го типа выявлен у 52,5%, у 18,8% отмечено наличие нарушения толерантности к глюкозе. У 92,5% больных было определено наличие инсулинорезистентности. Атерогенная дислипидемия наблюдалась у всех обследованных: в 15% – ГЛП 2А, 85% – ГЛП 2Б. У 83,8% пациентов была выявлена гиперурикемия.

Клинико-инструментальная характеристика групп представлена в табл. 1. Из данных таблицы следует, что 1-я и 2-я группы достоверно не различались по возрасту. В группе с АЖБП преобладали мужчины, а среди пациентов с НАЖБП было больше женщин. У всех пациентов с НАЖБП стеатоз развился в рамках метаболического синдрома (с проявлениями в виде ожирения, артериальной гипертензии, нарушений углеводного обмена, инсулинорезистентности), лишь у 7 пациентов с АЖБП отмечено наличие элементов метаболического синдрома. Вместе с тем, у пациентов обеих групп наблюдались дислипидемии, причем преобладал ГЛП 2Б тип. Среди пациентов с АЖБП достоверно преобладали курильщики со стажем курения 10,7 ± 2,6 года, курящих среди больных с НАЖБП было лишь 7,7%, причем курили они в среднем 1,02 ± 0,58 года. Все пациенты группы с АЖБП употребляли алкоголь в умеренных и токсических дозах (от 80 до 110 г чистого этанола) длительное время (23,1 ± 1,7), причем преобладал неблагоприятный в плане развития соматических осложнений хронической алкоголизации стиль потребления алкоголя – 2-4 раза в неделю у 86% обследуемых, остальные употребляли алкоголь ежедневно. В группе с НАЖБП употребляли алкоголь 9,6% пациентов, причем в дозах, не превышающих

1-2 дринков 1-2 раза в месяц (длительность потребления 3,62 ± 1,1 года).

У всех пациентов по данным УЗИ брюшной полости выявлены признаки жировой болезни печени, по данным непрямои эластометрии преобладающим в обеих группах оказался умеренный фиброз (F2); у 25% и 29% больных, соответственно, выявлен F3, но достоверных различий по степени фиброза в группах с АЖБП и НАЖБП не отмечено.

Пациенты обеих группы не различались по наличию и длительности артериальной гипертензии (подтвержденной УЗИ-признаками гипертрофии левого желудочка), инфекциям мочевых путей. Вместе с тем, у больных с АЖБП достоверно чаще наблюдались нарушения ритма и проводимости сердца ($p = 0,026$), ХОБЛ ($p < 0,05$), а в группе с НАЖБП – нарушения функции щитовидной железы с преобладанием гипотиреоза ($p = 0,025$).

При анализе показателей липидного спектра достоверных различий по уровню общего холестерина между группами не отмечено, уровни триглицеридов и ХС ЛПВП оказались достоверно выше у пациентов с НАЖБП ($p < 0,05$, $p = 0,003$, соответственно). Уровни глюкозы крови в группах достоверно не различались.

Наибольшие различия между группами выявлены в отношении уровней показателей печеночных проб. У пациентов с АЖБП выражены проявления синдрома цитолиза, гепатоцеллюлярной недостаточности, холестаза (достоверное повышение уровней трансаминаз с преобладанием АСТ, ГГТП, ЩФ, общего билирубина с повышением уровней обеих фракций), диспротеинемии (повышение уровня тимоловой пробы). Уровни сывороточного железа оказались достоверно выше, чем в группе сравнения, но в подгруппах не различались.

Пациенты с АЖБП имели большие отклонения в уровне мочевой кислоты ($p = 0,036$), креатинина ($p < 0,05$) по сравнению с НАЖБП. Это свидетельствует о большей вовлеченности нарушений пуринового обмена, функции почек.

Показатели гемостаза свидетельствуют о наличии признаков избыточного свертывания пристеночного характера на фоне хронических воспалительных процессов в обеих группах без достоверных различий между ними и значимыми отличиями от здоровых обследуемых. Следует отметить, что уровень волчаночного антикоагулянта у пациентов с АЖБП достоверно выше, чем у больных с НАЖБП, что свидетельствует о большей нестабильности клеточных мембран с тенденцией к избыточному свертыванию в данной группе.

Таблица 1

Клинико-инструментальная характеристика групп обследуемых

Показатели	1-я группа (АЖБП), n = 28	2-я группа (НАЖБП), n = 52	Группа сравнения, n = 20
1	2	3	4
Возраст, годы	55,8 + 2,1	57,9 + 1,3	54,7 + 1,3
Пол, n (%): женщины мужчины	8 (28,6%) 20 (71,4%)	40 (76,9%) 12 (23,1%) ****	10 (50%) 10 (50%) ****^
Проявления метаболического синдрома, n (%)	7 (25%)	52 (100%) ****	-
Нарушения углеводного обмена, n (%)	6 (21,4%)	52 (100%) ****	-
ИМТ, кг/м.кв.	25,8 + 1,0	34,2 + 0,86 **	24,2 + 1,3 *^^
Избыточная масса тела, n (%)	7 (25%)	52 (100%) ****	-
Дислипидемии, n (%)			-
ГЛП 2А	8 (28,6%)	4 (7,7%)	
ГЛП 2Б	20 (71,4%)	48 (92,3%)	
Курильщики, n (%)	19 (67,9%)	4 (7,7%) ****	1 (5%) ****^^
Употребление алкоголя, n (%)	28 (100%)	5 (9,6%) ****	2 (10%) ****
Стаж употребления алкоголя, лет	23,1 + 1,7	3,62 + 1,1 ****	-
Степень фиброза печени (НЭМ), n (%)			
F2	21 (75%)	37 (71%)	
F3	7 (25%)	15 (29%)	-
Нарушения ритма и проводимости сердца, n (%)	22 (78,6%)	15 (28,8%) ***	-
ХОБЛ, n (%)	10 (35,7%)	8 (15,3%) *	-
Инфекции мочевых путей, n (%)	11 (39,3%)	16 (30,8%)	-
Нарушения функции щитовидной железы, n (%)	5 (17,9%)	21 (40,4%) **	-
Наличие артериальной гипертензии, n (%)	26 (92,9%)	52 (100%)	-
Признаки гипертрофии левого желудочка (индекс Соколова-Лайона > 38 мм и/или ИММЛДЖ ≥ 125 г/м.кв., n (%))	26 (92,9%)	52 (100%)	-
Продолжительность АГ, годы	8,3 + 2,7	12,2 + 3,5	-
Общий холестерин, мг/дл	233,0 + 9,3	215,1 + 6,9	165,7 + 6,3 **^
Холестерин ЛПНП, мг/дл	41,4 + 1,7	49,6 + 1,5 ***	53,2 + 1,4 ****^
Триглицериды, мг/дл	209,6 + 21,5	232,4 + 12,2 *	145,5 + 11,6 **^^
Глюкоза крови натощак, ммоль/л	6,62 + 0,26	7,10 + 0,28	4,5 + 1,1 **^^
Общий белок, г/л	73,1 + 0,8	72,8 + 0,7	74,5 + 0,9
Альбумин, г/л	42,5 + 0,8	43,4 + 0,6	44,6 + 0,8
АЛТ, УЛ	50,57 + 5,6	27,9 + 2,6 ***	14,2 + 1,4 ****^^
АСТ, УЛ	55,75 + 7,7	23,9 + 1,5 ****	12,7 + 2,2 ****^^
ГГТП, УЛ	77,2 + 11,1	40,8 + 6,6 ***	15,3 + 1,8 ****^^
ЩФ, УЛ	233,0 + 16,3	179,7 + 6,6 **	124,2 + 5,3 ****^^
АМК, УЛ	64,8 + 4,8	56,1 + 7,6	47,2 + 5,1
Общий билирубин, мкмоль/л	18,6 + 2,3	12,3 + 0,8 *	11,9 + 0,9*
Прямой билирубин, мкмоль/л	9,1 + 1,9	5,5 + 0,3 ****	3,6 + 0,5 ****^
Тимоловая проба, ед.	4,7 + 1,5	3,5 + 1,6	1,1 + 0,9 **^^
Мочевая кислота, мг/дл	377,8 + 18,8	331,7 + 16,1 *	167,7 + 11,5 ****^^
Креатинин, мкмоль/л	85,0 + 2,4	76,8 + 1,2*	57,7 + 1,8 **^^
Мочевина, ммоль/л	6,2 + 1,9	7,3 + 2,1	5,3 + 1,8*^
Железо сыворотки, мкмоль/л	16,7 + 1,9	16,9 + 1,2	10,3 + 1,4 **^^
ОЖСС, мг/дл	53,0 + 3,0	66,9 + 10,7	59,7 + 3,8
АЧТВ, с	41,5 + 1,6	41,3 + 0,96	38,2 + 0,8
Протромбиновое индекс, %	99,8 + 1,2	100,6 + 2,1	104,5 + 1,4
Международное нормализованное отношение (МНО)	0,99 + 0,01	1,065 + 0,04	1,082 + 0,05
РКФМ, г/л	0,08 + 0,006	0,1 + 0,02	0,038 + 0,01 ****^^
Хагеман-зависимый фибринолиз (ХЗФ), мин.	8,5 + 1,5	6,3 + 0,3	6,7 + 0,8*

Окончание табл. 1			
1	2	3	4
Фибриноген, г/л	4,9 + 0,2	4,5 + 0,3	2,8 + 0,5***^^^
Антитромбин III, %	100,0 + 10,7	132,7 + 15,9	105,9 + 8,2^
Волчаночный антикоагулянт, усл. Ед.	1,1 + 0,02	0,95 + 0,01*	0,92 + 0,04**
Количество эритроцитов, $\times 10^{12}/л$	4,56 + 0,10	4,54 + 0,05	4,59 + 0,10
Уровень гемоглобина, г/л	137,7 + 2,0	140,9 + 3,6	145,6 + 2,7
Цветовой показатель	0,93 + 0,02	0,89 + 0,01	0,94 + 0,01
Ретикулоциты, %	1,7 + 0,2	1,0 + 0,04**	0,6 + 0,05***^^
СОЭ, мм/ч	16,4 + 2,1	20,0 + 1,4*	9,2 + 1,6 ***^^
Количество тромбоцитов, $\times 10^9/л$	221,8 + 10,8	212,6 + 8,3	246,6 + 9,5
Количество лейкоцитов, $\times 10^9/л$	6,80 + 0,45	6,57 + 0,30	5,2 + 0,29

Примечание. М – среднее, m – средняя ошибка, * – достоверность (p) отличия от 1-й группы (* – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$, **** – $p < 0,0001$); ^ – достоверность (p) отличия от 2-й группы (^ – $p < 0,05$, ^^ – $p < 0,01$, ^^ – $p < 0,001$, ^^ – $p < 0,0001$).

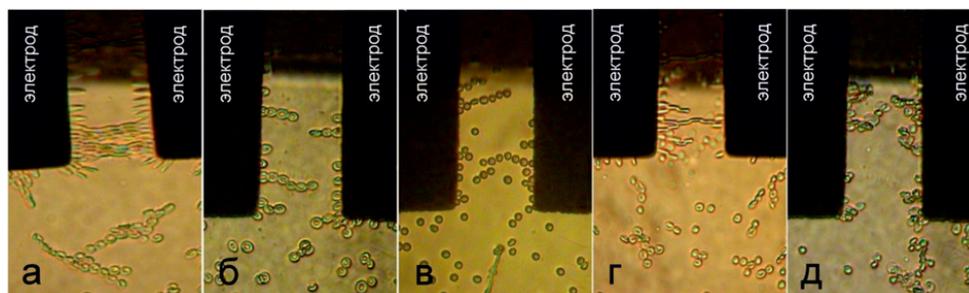


Рис. 1. Разделение и деформация эритроцитов под действием неоднородного переменного электрического поля на частоте 1 МГц: а – у лиц группы сравнения; б – у больных с НАЖБП (сниженная амплитуда деформации эритроцитов); в – у больных с АЖБП (низкая амплитуда деформации эритроцитов); г – повышенный гемолиз эритроцитов на частоте 10^6 МГц у больных с АЖБП; д – повышенное образование агрегатов у пациентов с АЖБП

Большая часть показателей при исследовании общего анализа крови достоверно не различалась между группами. Однако у больных с АЖБП достоверно выше оказался уровень ретикулоцитов и ниже – СОЭ по сравнению с группой с НАЖБП.

Таким образом, в группе пациентов с АЖБП стеатоз развился на фоне многолетнего употребления алкоголя в неблагоприятном в отношении соматических осложнений стиле, отличался большей биохимической активностью, большей выраженностью нестабильности мембран клеток. У больных с НАЖБП патология печени являлась проявлением метаболического синдрома, что сказывалось на особенностях биохимических параметров; биохимическая активность диффузной патологии печени носила минимальный характер, что не препятствовало прогрессированию фиброза печени (у большинства пациентов он находился на уровне F2-3).

Исследование электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов методом диэлектрофореза

Наблюдения за характером поведения эритроцитов в НПЭП показали, что эритроциты здоровых лиц на частотах 5×10^5 Гц и 10^6 Гц обнаружили ярко выраженную способность к деформации (рис. 1, а). Они вытягивались и приобретали высокую поступательную скорость в сторону ближайшего электрода. На частотах 5×10^4 Гц, 10^5 Гц деформации не наблюдалось, клетки отталкивались от электродов (отрицательный диэлектрофорез), единичные клетки под действием поля разрушались.

У больных с жировой болезнью печени взаимодействие эритроцитов с НПЭП было другим: амплитуда деформации (m) и скорость поступательного движения клеток (мкм/с) относительно электродов на высоких частотах 5×10^5 Гц и 10^6 Гц были значительно ниже ($p < 0,01$) (рис. 1, б, в).

Избыточный гемолиз клеток наблюдался как на высоких (10^6 Гц, 5×10^5 Гц) (рис. 1, г), так и на низких частотах (5×10^4 Гц, 10^5 Гц). Отмечалась также повышенная способность эритроцитов к образованию агрегатов крупных и средних размеров после перевода эритроцитов в раствор 0,3М сахарозы ($p < 0,02$) (рис. 1, д).

Выявлены различия в поведении эритроцитов, связанные с генезом жировой болезни печени. Эритроциты пациентов с НАЖБП после перевода в раствор сахарозы преимущественно имели дискоцитарную форму, 13,5% клеток приобретали форму «спущенного мяча» или сфероцитарную. Уровень недискоцитарных форм у больных с АЖБП возрастал до 32,1% ($p = 0,046$), кроме того, большая часть клеток отличалась бугристой, шиповидной поверхностью (78,6% против 46,2%, $p = 0,029$), что отражает выраженный дефицит внутриклеточных макроэргических соединений, связанный с воздействием этанола [7, 8, 9].

Эритроциты пациентов с АЖБП имели более низкий поверхностный заряд по сравнению с клетками красной крови больных с НАЖБП, что отражали более низкие уровни скорости движения к электродам, величина дипольного момента. Данное обстоятельство, очевидно, связано со снижением уровня сиаловых кислот, определяющих заряд клетки, на поверхности эритроцитов под действием этанола, оседания на мембранах крупномолекулярных белков из сыворотки крови в связи с выраженностью диспротеинемии при алкогольном поражении печени [6, 9, 10]. При алкогольной жировой болезни печени способность клеток к деформации оказалась достоверно ниже, чем при неалкогольном генезе заболевания. Причем, низкие амплитуды деформации отмечены на всех частотах. Доля лиц, имеющих минимальную пластичность при алкогольном генезе, оказалась максимальной (92,9% против 42,3% в группе с НАЖБП, $p < 0,0001$). Низкая деформабельность при АЖБП отмечена на фоне максимально высоких обобщенных показателей вязкости ($r = -0,69$, $p = 0,002$) и жесткости ($r = -0,74$, $p < 0,001$). Большие изменения пластичности клеток при алкогольном генезе заболевания, вероятно, связаны как с большими структурными сдвигами в мембранах под действием этанола (в том числе, появление аномальных фосфолипидов, этиловых эфиров жирных кислот), так и с изменением в структуре гемоглобина, появлению «сшивок» между ним и внутренней структурой мембран [2, 7, 8]. Увеличение относительного содержания холестеринной фракции, насы-

щенных жирных кислот и более низкий уровень общих липидов и фосфолипидов, триглицеридов, эфиров холестерина и ненасыщенных жирных кислот в мембранах эритроцитов, приводящих к снижению деформабельности, происходит как при АЖБП, так и при НАЖБП, и определяется выраженными сдвигами липидного профиля сыворотки крови [2, 6].

Мембраны клеток красной крови при алкогольном генезе жировой болезни печени имели тенденцию к более высокой электропроводности, большей толщине по сравнению с больными с НАЖБП, что определяется мембранотоксичностью этанола, ацетальдегида, которые усугубляют воздействие на мембраны клеток свободных жирных кислот [3, 6, 9].

Наличие выраженного токсического компонента в виде этанола отражалось в большем смещении равновесной частоты в высокочастотный диапазон при АЖБП по сравнению с НАЖБП ($p = 0,029$). Данное обстоятельство еще в большей степени повлияло на показатель поляризуемости, отражающей жизнеспособность клеток. Он оказался достоверно ниже при АЖБП по сравнению с НАЖБП ($p < 0,0001$). Подобные сдвиги отражают «хрупкость» клеток, склонность их к деструкции при воздействии стрессов различной интенсивности. Повышенный гемолиз эритроцитов выявлялся на разных частотах (модели стресса различной интенсивности) как у пациентов с АЖБП, так и НАЖБП, но выраженность лизиса была большей при алкогольном генезе. Достоверные различия в уровне индекса деструкции выявлены на высокой частоте 10^6 Гц ($p < 0,05$).

Различия в вязкоупругих и электрических характеристиках эритроцитов у больных с алкогольной и неалкогольной жировой болезнью печени представлены в табл. 2.

Дифференцирующими параметрами вязкоупругих и электрических свойств эритроцитов между пациентами с алкогольной и неалкогольной жировой болезнью печени оказались: средний диаметр эритроцита, амплитуда деформации при частоте 10^6 Гц, степень деформации при $0,5 \times 10^6$ Гц, обобщенные показатели вязкости и жесткости, поляризуемость при частоте 10^6 Гц, величина дипольного момента ($p < 0,0001-0,001$). В меньшей степени достоверности различают стеатоз различного генеза – преобладание диско- или сфероцитарных форм, наличие бугристых, шиповидных клеток, индекс деструкции клеток при частоте 10^6 Гц, положение равновесной частоты, скорость движения клеток к электродам ($p < 0,02-0,05$).

Таблица 2

Вязкоупругие и электрические характеристики эритроцитов у больных с жировой болезнью печени различного генеза и в группе сравнения ($M \pm m$)

Показатели эритроцитов	1-я группа (АЖБП), n = 28	2-я группа (НАЖБП), n = 52	Группа сравнения, n = 20
Средний диаметр эритроцита [мкм]	7,44 ± 0,02	7,29 ± 0,02****	7,51 ± 0,03***^^^
Преобладающая форма Eг, n (%): сфероциты дискоциты	9 (32,1%) 19 (67,9%)	7 (13,5%) 45 (86,5%) *	1 (5%) 19 (95%) ***^^
Бугристые, шиповидные Eг, n (%)	22 (78,6%)	24 (46,2%) **	1 (5%) *****^^
Амплитуда деформации [м] при 10 ⁶ Гц	0,53·10 ⁻⁶ ± 0,009·10 ⁻⁶	0,64·10 ⁻⁶ ± 0,01·10 ⁻⁶ ****	2,6·10 ⁻⁶ ± 0,07·10 ⁻⁶ *****^^^
Степень деформации при 0,5х10 ⁶ Гц (%)	34,2 ± 1,6	51,6 ± 1,7****	87,74 ± 2,9*****^^^
Доля пациентов с низким уровнем амплитуды деформации Eг, n (%)	26 (92,9%)	22 (42,3%) ***	-
Обобщенный показатель жесткости [Н/м]	10,1·10 ⁻⁶ ± 0,04·10 ⁻⁷	9,39·10 ⁻⁶ ± 0,08·10 ⁻⁷ ****	4,5·10 ⁻⁶ ± 0,6·10 ⁻⁶ *****^^^
Обобщенный показатель вязкости [Па·с]	0,78 ± 0,004	0,70 ± 0,007****	0,32 ± 0,03*****^^^
Индекс агрегации Eг [усл.ед.]	0,70 ± 0,01	0,68 ± 0,007	0,44 ± 0,02***^^^
Индекс деструкции Eг [%] при 10 ⁶ Гц	3,4 ± 0,5	2,1 ± 0,2*	1,0 ± 0,4***^^^
Индекс деструкции Eг [%] при 0,5х10 ⁶ Гц	4,6 ± 0,4	3,5 ± 0,4	0,6 ± 0,02***^^^
Индекс деструкции Eг [%] при 0,1х10 ⁶ Гц	3,6 ± 0,5	3,2 ± 0,5	0,4 ± 0,04***^^^
Индекс деструкции Eг [%] при 0,05х10 ⁶ Гц	3,1 ± 0,4	2,6 ± 0,3	0,3 ± 0,03***^^^
Поляризуемость [м ³] 10 ⁶ Гц	0,429·10 ⁻¹⁵ ± 0,005·10 ⁻¹⁵	0,462·10 ⁻¹⁵ ± 0,004·10 ⁻¹⁶ ****	4,3·10 ⁻¹⁵ ± 0,8·10 ⁻¹⁵ ***^^^
Электропроводность [См/м]	7,6·10 ⁻⁵ ± 0,28·10 ⁻⁵	7,0·10 ⁻⁵ ± 0,22·10 ⁻⁵	2,9·10 ⁻⁵ ± 0,4·10 ⁻⁵ ***^^^
Емкость клеточной мембраны [Ф]	3,5·10 ⁻¹⁴ ± 0,5·10 ⁻¹⁴	4,9·10 ⁻¹⁴ ± 0,5·10 ⁻¹⁴	7,3·10 ⁻¹⁴ ± 0,8·10 ⁻¹⁴ ***^^^
Скорость движения Eг к электродам [мкм/с]	4,5 ± 0,3	5,3 ± 0,2*	12,9 ± 1,8***^^^
Равновесная частота [Гц]	1,43·10 ⁶ ± 0,18·10 ⁶	1,2·10 ⁶ ± 0,23·10 ⁶ **	0,47·10 ⁶ ± 0,07·10 ⁶ *****^^^
Дипольный момент [Клм]	0,32·10 ⁻²¹ ± 0,07·10 ⁻²¹	0,54·10 ⁻²¹ ± 0,09·10 ⁻²¹ ****	1,5·10 ⁻²¹ ± 0,4·10 ⁻²¹ *****^^^

Примечание. M – среднее, m – средняя ошибка, * – достоверность (p) отличия от 1-й группы (* – p < 0,05, ** – p < 0,02, *** – p < 0,001, **** – p < 0,0001); ^ – достоверность (p) отличия от 2-й группы (^ – p < 0,05, ^^ – p < 0,02, ^^ ^ – p < 0,001, ^^ ^^ – p < 0,0001). Величина дипольного момента рассчитывалась при напряженности электрического поля 8,85·10⁻¹²Ф/м.

Таким образом, пациенты с алкогольной жировой болезнью печени отличались от больных с неалкогольной жировой болезнью печени эритроцитами большего размера с низкой деформабельностью при стрессах различной интенсивности на фоне высоких обобщенных показателей вязкости и жесткости, с низкой жизнеспособностью и склонностью к деструкции при высоких нагрузках, имеющие низкий поверхностный заряд с признаками токсического воздействия.

Данные анализа корреляций вязкоупругих параметров эритроцитов с данными клинико-инструментального, биохимического обследования пациентов представлен в табл. 3. Установлены ассоциации характе-

ристик клеток красной крови с алкогольным и неалкогольным генезом жировой болезни печени, стилем потребления алкоголя, показателями синдрома цитолиза, холестаза. Выявлено также прямые корреляции индекса агрегации при 10⁶Гц с уровнем ретикулоцитов (r = + 0,826, p = 0,011), уровнем волчаночного антикоагулянта (r = + 0,77, p = 0,03) и обратные – с уровнем поляризуемости на частоте 10⁶Гц (r = – 0,377, p = 0,002).

Для оценки значимости параметров эритроцитов с точки зрения дифференциальной диагностики алкогольной и неалкогольной жировой болезни печени был использован ROC-анализ с помощью построения приемных характеристических

кривых (ROC-кривые) для различных характеристик клеток красной крови, результаты которого представлены на рис. 2. Получены высокие уровни AUC для наиболее значимых параметров эритроцитов (0,719-0,857), свидетельствующие о достаточно

высоких уровнях показателей чувствительности и специфичности для отдельно взятых показателей клеток красной крови в качестве диагностических маркеров алкогольной и неалкогольной жировой болезни печени.

Таблица 3

Корреляции вязкоупругих и электрических характеристик эритроцитов у больных с жировой болезнью печени различного генеза с клинико-биохимическими показателями

Показатели эритроцитов	Генез жировой болезни печени (1-АЖБП, 2-НАЖБП)	Стиль потребления алкоголя	АЛТ, У/л	АСТ, У/л	ГГТП, У/л	Прямой билирубин, мкмоль/л
Средний диаметр эритроцита [мкм]	0,492 (0,000)	0,431 (0,000)	н	н	н	н
Преобладающая форма Eг, n (%) сфероциты дискоциты	0,223 (0,047)	н	н	н	н	н
Бугристые, шиповидные Eг, n (%)	- 0,244 (0,029)	0,365 (0,002)	0,314 (0,005)	0,405 (0,000)	0,214 (0,075)	н
Амплитуда деформации [м] при 10 ⁶ Гц	0,586 (0,000)	-0,549 (0,000)	-0,277 (0,013)	-0,264 (0,028)	-0,318 (0,007)	-0,252 (0,006)
Степень деформации при 0,5x10 ⁶ Гц (%)	0,616 (0,000)	- 0,602 (0,000)	-0,227 (0,034)	-0,199 (0,077)	-0,324 (0,006)	-0,339 (0,014)
Доля пациентов с низким уровнем амплитуды деформации Eг, n (%)	0,597 (0,000)	0,742 (0,000)	0,421 (0,001)	0,405 (0,03)	0,481 (0,001)	0,539 (0,02)
Обобщенный показатель жесткости [Н/м]	-0,601 (0,000)	0,585 (0,000)	0,287 (0,01)	0,257 (0,021)	0,339 (0,004)	0,256 (0,006)
Обобщенный показатель вязкости [Па · с]	-0,62 (0,000)	0,603 (0,000)	0,307 (0,006)	0,291 (0,009)	0,359 (0,002)	0,234 (0,05)
Индекс агрегации Eг, [усл.ед.]	н	0,306 (0,009)	0,23 (0,04)	0,214 (0,05)	н	н
Индекс деструкции Eг [%] при 10 ⁶ Гц	-0,676 (0,046)	н	н	н	н	н
Индекс деструкции Eг [%] при 0,5x10 ⁶ Гц	н	н	н	н	н	н
Индекс деструкции Eг [%] при 0,1x10 ⁶ Гц	н	н	н	н	н	н
Индекс деструкции Eг [%] при 0,05x10 ⁶ Гц	н	н	н	н	н	н
Поляризуемость [м ²] 10 ⁶ Гц	0,479 (0,000)	-0,508 (0,000)	-0,451 (0,01)	-0,571 (0,02)	н	-0,375 (0,006)
Электропроводность [См/м]	-0,208 (0,064)	0,298 (0,011)	н	н	н	н
Емкость клеточной мембраны [Ф]	н	-0,241 (0,043)	н	н	н	н
Скорость движения Eг к электродам [мкм/с]	0,228 (0,042)	- 0,334 (0,004)	н	н	н	н
Равновесная частота [Гц]	-0,293 (0,008)	0,355 (0,002)	0,212 (0,059)	0,228 (0,042)	0,243 (0,043)	н
Дипольный момент [Кл·м]	0,675 (0,000)	н	-0,47 (0,01)	-0,53 (0,017)	-0,45 (0,04)	-0,57 (0,01)

Пр и м е ч а н и е . В круглых скобках указан показатель достоверности данного коэффициента корреляции, н – корреляция статистически незначима.

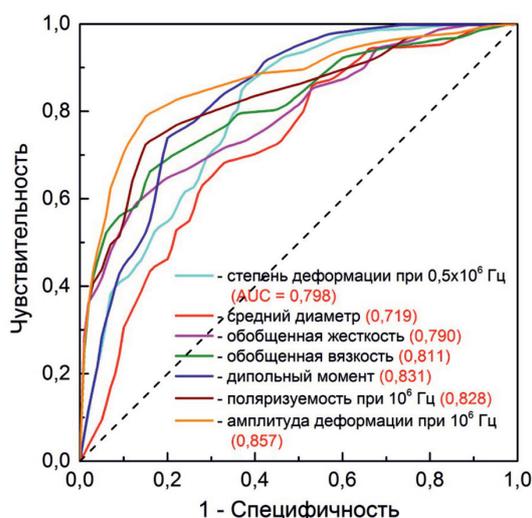


Рис. 2. ROC-кривые электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов для дифференциальной диагностики алкогольной и неалкогольной жировой болезни печени

Результаты оценки совокупности электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов пациентов со стеатозом различного генеза для выявления алкогольной и неалкогольной жировой болезни печени по сравнению с данными совокупных клинико-инструментальных методов исследования представлены в табл. 4.

Они демонстрируют достаточно высокие значения чувствительности (88,5%) и специфичности (92,9%), прогностической ценности положительного (95,8%)

и отрицательного результата (81,3%), а также индекса точности (90%). Возросшие уровни данных значений при исследовании совокупности параметров эритроцитов по сравнению с изолированным исследованием отдельных показателей клеток красной крови дают возможность предположить необходимость использования «панели электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов» исследования крови для дифференциальной диагностики алкогольной и неалкогольной жировой болезни печени. Особенно важны перспективы в определении истинно положительных результатов по алкогольной жировой болезни печени (по данным прогностической ценности «-» результата) в связи с необходимостью комплекса социальных, терапевтических, адаптационных мероприятий.

Заключение

Таким образом, метод диэлектрофореза эритроцитов в неоднородном переменном электрическом поле является перспективным в дифференциальной диагностике алкогольной и неалкогольной жировой болезни печени. Наиболее значимыми для целей диагностики оказались: средний диаметр эритроцита, амплитуда деформации при частоте 10^6 Гц, степень деформации при $0,5 \times 10^6$ Гц, обобщенные показатели вязкости и жесткости, поляризуемость при частоте 10⁶ Гц, величина дипольного момента. Комплексное использование параметров эритроцитов в отношении дифференцирования патологии печени различного генеза демонстрирует достаточно высокие значения чувствительности (88,5%) и специфичности (92,9%).

Таблица 4

Результаты оценки совокупности электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов для выявления алкогольной и неалкогольной жировой болезни печени по сравнению с данными клинико-инструментальных методов исследования

Результаты использования электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов	Результаты клинико-инструментальных методов исследования	
	Группа НАЖБП n = 52 случаев	Группа АЖБП n = 28 случаев
Группа НАЖБП n = 48 случаев	Истинно положительный Группа НАЖБП n = 46	Ложно положительный Группа АЖБП n = 2
Группа АЖБП n = 32 случаев	Ложно отрицательный Группа НАЖБП n = 6	Истинно положительный Группа АЖБП n = 26

Чувствительность	$46 : (46 + 6) \times 100\% = 88,5\%$
Специфичность	$26 : (2 + 26) \times 100\% = 92,9\%$
Прогностическая ценность «+» результата метода	$46 : (46 + 2) \times 100\% = 95,8\%$
Прогностическая ценность «-» результата метода	$26 : (6 + 26) \times 100\% = 81,3\%$
Индекс точности	$(46 + 26) / (46 + 2 + 6 + 26) \times 100\% = 90\%$

Список литературы

1. 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. Использование оптических методов исследования крови в диагностике стадии заболевания при диффузной патологии печени // Архив внутренней медицины. – 2012. – № 4. – С. 46-54.
2. Генералов В.М., Кручинина М.В., Дурыманов А.Г., Медведев А.А., Сафатов А.С., Сергеев А.Н., Бурак Г.А., Курилович С.А., Громов А.А. Диэлектрофорез в диагностике инфекционных и неинфекционных заболеваний. – Новосибирск: Изд-во «ЦЭРИС», 2011. – 172 с.
3. Драпкина О.М., Смирин В.И., Ивашкин В.Т. Патогенез, лечение и эпидемиология НАЖБП – что нового? Эпидемиология НАЖБП в России // РМЖ. – 2011. – Т. 28. – С. 1717–1721.
4. Кручинина М.В., Генералов В.М., Курилович С.А., Громов А.А. Диэлектрофорез эритроцитов в диагностике диффузных заболеваний печени различной этиологии // Архив внутренней медицины. – 2011. – № 2. – С. 58-63.
5. Кручинина М.В., Генералов В.М., Генералов К.В., Курилович С.А., Воевода М.И., Покровский А.Г., Громов А.А., Зайцев Б.Н., Баум В.А., Пустыльняк В.О., Чересиз С.В., Сакаева Г.Р., Корбут А.И., Немцова Е.Г., Кранц Е.Ю., Кудина Д.И., Ковалькова Н.А. Определение степени фиброза печени методом диэлектрофореза // Вестник НГУ. – 2013. – Т. 11. – Вып. 2. – С. 66-75.
6. Махов В.М. Алкогольная болезнь печени и неалкогольная жировая болезнь печени – общность и различия // Лечащий врач. – 2012. – Т.7. – С. 22-28.
7. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А. Физиология и патофизиология эритроцита. Томск: Изд-во Том. Ун-та, 2004. – 202 с.
8. Сторожок С.А., Панченко Л.Ф., Филиппович Ю.Д., Глушков В.С. Изменения физико-химических свойств биологических мембран при развитии толерантности к этанолу // Вопросы медицинской химии. – 2001. – № 2. – С. 42-51.
9. Хомерики С. Г., Хомерики Н. М. Алкогольная болезнь печени: механизмы развития, морфологические проявления, дифференциальная диагностика и патогенетические подходы к терапии // Consilium medicum. Гастроэнтерология. – 2012. – Т. 1. – С. 27–34.
10. Шифман Ф.Дж. Патофизиология крови. – Пер с англ. Жибурга Е.Б., Токарева Ю.Н. – М.-СПб.: «Издательство БИНОМ» – «Невский диалог», 2000. – 448 с.
11. Balmer M.L., Dufour J.F., Non-alcoholic steatohepatitis – from NAFLD to MAFLD // Ther. Umsch. – 2011. – V.68, No. 4. – P. 183-188.