

# ЖИРОВАЯ БОЛЕЗНЬ ПЕЧЕНИ СМЕШАННОГО ГЕНЕЗА: ОСОБЕННОСТИ ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ И ВЯЗКОУПРУГИХ ПАРАМЕТРОВ ЭРИТРОЦИТОВ<sup>1</sup>

## FATTY LIVER DISEASE OF MIXED GENESIS: FEATURES OF ELECTRIC AND VISCOELASTIC PARAMETERS OF ERYTHROCYTES

**M. Kruchinina**  
**A. Belkovets**  
**M. Parulikova**  
**A. Gromov**

**Summary.** The aim of the work is to study the features of electrical and viscoelastic parameters of erythrocytes of patients with fatty liver disease of mixed genesis (metabolic + alcoholic) using the method of dielectrophoresis.

**Materials and methods.** 31 men (50.6 ± 9.9 years old) with fatty liver disease (FLD) of mixed genesis (metabolic + alcoholic) with a degree of fibrosis 0–1 (FibroScan® 502 Echosens, France) were examined. The electrical, viscoelastic parameters of erythrocytes were studied by dielectrophoresis using an electro-optical cell detection system in an inhomogeneous alternating electric field.

**Results.** It was found that patients with fatty liver disease of mixed genesis (metabolic + alcoholic), compared with the control group, had erythrocytes of smaller diameter ( $p < 0.05$ ), with a greater proportion of spherocytic ( $p = 0.0004$ ), deformed forms ( $p = 0.0005$ ) with less ability to deform ( $p < 0.0001$ ), higher summerized indicators of viscosity ( $p < 0.0001$ ), rigidity ( $p < 0.0001$ ). The red blood cells of patients with FLD had a lower surface charge, reflected by lower values of cell velocity to the electrodes ( $p < 0.001$ ), dipole moment ( $p < 0.0001$ ), higher aggregation index ( $p = 0.002$ ). The membranes of erythrocytes with FLD had a higher ability to conduct electric current ( $p < 0.0001$ ), a lower capacity ( $p < 0.00001$ ). In mixed genesis FLD, reduced resistance of erythrocytes is associated with lower levels of polarizability at high frequencies of the electric field ( $10^6$ ;  $0,5 \times 10^6$  Hz) ( $p < 0.00001$ ), relative polarizability ( $p < 0.001$ ) and higher — at frequencies of  $0,1 \times 10^6$  and  $0,05 \times 10^6$  Hz ( $p < 0.0001$ ), as well as a tendency to hemolysis at all frequencies of the electric field ( $p = 0.01–0.05$ ). The equilibrium frequency at the FLD is shifted to the high-frequency range ( $p = 0.0003$ ). Correlations of the levels of electrical, viscoelastic parameters of erythrocytes with biochemical indicators reflecting the manifestation of metabolic syndrome, liver function disorders, and with indicators of alcohol consumption style, which probably reflects the potentiating effect of two etiological factors on red blood cells.

**Conclusion.** The revealed features of the electrical, viscoelastic parameters of erythrocytes in patients with mixed genesis fatty liver disease

**Кручинина Маргарита Витальевна**

д.м.н., доцент, зав. лабораторией гастроэнтерологии, ведущий научный сотрудник, лаборатория гастроэнтерологии НИИ терапии и профилактической медицины — филиала ИЦиГ СО РАН; Профессор. Новосибирский государственный медицинский университет  
kruchmargo@yandex.ru

**Белковец Анна Владимировна**

д.м.н., доцент, старший научный сотрудник, лаборатория гастроэнтерологии НИИ терапии и профилактической медицины — филиала ИЦиГ СО РАН; Профессор, Новосибирский государственный медицинский университет  
belkovets@gmx.de

**Паруликова Марина Владимировна**

Старший преподаватель, отдел образования НИИ ТПМ — филиала ИЦиГ СО РАН, врач-гастроэнтеролог, г. Новосибирск,  
m\_parulikova@mail.ru

**Громов Андрей Александрович**

к.м.н., старший научный сотрудник, лаборатория клинических биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний, руководитель Центра профилактики тромбозов, НИИ ТПМ — филиала ИЦиГ СО РАН  
gromov.center@rambler.ru

**Аннотация.** Целью данного исследования является изучение особенностей электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов пациентов с жировой болезнью печени смешанного генеза (метаболический + алкогольный) с помощью метода диэлектрофореза.

**Материалы и методы.** Обследован 31 мужчина (50,6 ± 9,9 года) с жировой болезнью печени смешанного генеза (метаболический + алкогольный) со степенью фиброза 0–1 (FibroScan® 502 Echosens, Франция). Электрические, вязкоупругие параметры эритроцитов исследованы методом диэлектрофореза с помощью электрооптической системы детекции клеток в неоднородном переменном электрическом поле.

**Результаты.** Установлено, что пациенты с жировой болезнью печени смешанного генеза (метаболический + алкогольный) по сравнению с группой контроля имели эритроциты меньшего диаметра ( $p < 0,05$ ), с большей долей сфероцитарных ( $p = 0,0004$ ), деформированных форм ( $p = 0,0005$ ) с меньшей способностью к деформации ( $p < 0,0001$ ), более высокими обобщенными показателями вязкости ( $p < 0,0001$ ), жесткости ( $p < 0,0001$ ). Клетки красной крови пациентов с ЖБП имели более низкий поверхностный заряд, отражаемый более низкими величинами скорости движения клеток к электро-

<sup>1</sup> Работа выполнена по Государственному заданию в рамках бюджетных тем FWNR-2022-0024, FWNR-2023-0003

(metabolic + alcoholic) should be considered promising as biomarkers of this pathology and targets for therapeutic effects.

*Keywords:* fatty liver disease, mixed genesis, erythrocyte parameters, dielectrophoresis.

**Ж**ировая болезнь печени — ЖБП (жировой гепатоз, стеатоз, жировая инфильтрация, жировая дистрофия печени) — это хроническая патология, характеризующаяся повышенной аккумуляцией жира в печени, при которой происходит перерождение гепатоцитов в жировую ткань. Эта патология приобретает характер неинфекционной пандемии как в России (~37,3 % данные DIREG 2, 2015) [1], так и в странах Европы, США (20-33%) [2]. ЖБП гетерогенна, включает в себя алкогольную болезнь печени (АБП), связанную с потреблением гепатотоксических доз этанола, неалкогольную, первичную — НАЖБП, ассоциированную с проявлениями метаболического синдрома, после исключения перечня других неалкогольных этиологических факторов [3]. Общность морфологических изменений, звеньев патогенеза, метаболических сдвигов, перекреста предрасполагающих факторов послужила основанием для выделения новой нозологической формы — метаболически ассоциированной жировой болезни печени (metabolic associated fatty liver disease, MAFLD), рассматриваемой в рамках концепции «множественных параллельных ударов» [4].

Неблагоприятные гепатологические исходы у пациентов с ЖБП связаны с развитием фиброза печени, одним из факторов прогрессирования которого является гипоксия, в том числе, связанная с функциональным состоянием клеток красной крови [5]. Данные литературы свидетельствуют о наличии изменений структурно-функциональных параметров эритроцитов при алкогольном генезе заболевания (увеличение среднего корпускулярного объема эритроцитов, появление повышенного уровня триангулоцитов, обнаружение аномального фос-

дам ( $p < 0,001$ ), дипольного момента ( $p < 0,0001$ ), более высоким индексом агрегации ( $p = 0,002$ ). Мембраны эритроцитов при ЖБП обладали более высокой способностью проводить электрический ток ( $p < 0,0001$ ), более низкой емкостью ( $p < 0,00001$ ). При ЖБП смешанного генеза сниженная резистентность эритроцитов ассоциирована с более низкими уровнями поляризуемости на высоких частотах электрического поля ( $10^6$ ,  $0,5 \times 10^6$  Гц) ( $p < 0,00001$ ), относительной поляризуемости ( $p < 0,001$ ) и более высокими — на частотах  $0,1 \times 10^6$  и  $0,05 \times 10^6$  Гц ( $p < 0,0001$ ), а также склонностью к гемолизу на всех частотах электрического поля ( $p = 0,01-0,05$ ). Равновесная частота при ЖБП сдвинута в высокочастотный диапазон ( $p = 0,0003$ ). Установлены корреляции уровней электрических, вязкоупругих параметров эритроцитов с биохимическими показателями, отражающими проявление метаболического синдрома, нарушения функции печени и с показателями стиля потребления алкоголя, что, вероятно, отражает потенцирующий эффект двух этиологических факторов на клетки красной крови. *Заключение.* Выявленные особенности электрических, вязкоупругих параметров эритроцитов у пациентов с ЖБП смешанного генеза (метаболический + алкогольный) следует считать перспективными в качестве биомаркеров данной патологии и таргетов для терапевтических воздействий.

*Ключевые слова:* жировая болезнь печени, смешанный генез, параметры эритроцитов, диэлектрофорез.

фолипида в мембранах клеток — фосфатидилэтанола, повышение уровня очень длинноцепочечных жирных кислот в составе фосфолипидов мембран и др.) [5, 6], неалкогольной жировой болезни печени (изменение соотношения фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина, профиля жирных кислот в мембране клеток [7], количества эритроцитов и ширины распределения эритроцитов по объему, снижение деформируемости клеток [8], в том числе, в связи с повышенным уровнем гликозилированного гемоглобина [9], изменение эритроцитарного паттерна цитокинов, сигнальных липидов [10]). Публикации об изменениях характеристик эритроцитов при смешанном генезе жировой болезни печени (метаболический + алкогольный) малочисленны.

Измененные параметры эритроцитов при ЖБП могут служить биомаркерами при диагностике данной патологии и потенциальными терапевтическими таргетами. Улучшение состояния клеток красной крови с помощью фармакологических воздействий может оказаться полезным в комплексной терапии пациентов этого профиля для снижения выраженности тканевой гипоксии — триггера фиброгенеза.

Обследован 31 мужчина ( $50,6 \pm 9,9$  года) с жировой болезнью печени по данным УЗИ органов брюшной полости. Степень выраженности фиброза печени установлена методом непрямой эластометрии на аппарате FibroScan® 502 Echosens, Франция с разграничением стадии фиброза по шкале METAVIR от F0 до F4. У всех обследованных она не превышала первой степени.

У обследованных диагностирована смешанная этиология заболевания (метаболическая + алкогольная), по-

сколько установлено регулярное потребление алкоголя пациентами с проявлениями метаболического синдрома согласно Рекомендациям экспертов ВНОК [11].

Вирусная этиология заболевания исключена на основании отсутствия серологических маркеров методом иммуноферментного анализа (ИФА) и/или ДНК и РНК вирусов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). У пациентов были исключены генетически детерминированные заболевания, ассоциированные с ЖБП, аутоиммунный гепатит. Лекарственный анамнез и отмена препаратов повышенного риска поражения печени обеспечили исключение лекарственного гепатита. У пациентов не было длительного (более двух недель) парентерального питания как возможной причины развития ЖБП.

Всем мужчинам, включенным в исследование, определены индексы NAFLD liver fat score [12], Caro [13], подтверждающие наличие инсулинорезистентности и стеатоза печени.

В качестве группы сравнения отобраны мужчины, проходившие профилактическое обследование — 28 человек (средний возраст  $47,3 \pm 14,3$  года), ведущих здоровый образ жизни, употребляющих алкоголь не чаще 1–2 раз в месяц в дозах, не превышающих 20 г в сутки в пересчете на чистый этанол, без манифестирующей патологии внутренних органов и проявлений метаболического синдрома.

Пациентам и лицам группы сравнения проведено комплексное клиничко-инструментальное обследование, включающее изучение показателей красной крови, биохимии.

У всех обследованных изучены электрические и вязкоупругие параметры эритроцитов методом диэлектрофореза в неоднородном переменном электрическом поле (НПЭП) с помощью электрооптической системы детекции клеток [14]. Оценивали средний диаметр (мкм), доли дискоцитов, сфероцитов, деформированных клеток (%), поляризуемость клеток на разных частотах диапазона ( $m^3$ ), относительную поляризуемость (соотношение величины показателя на  $10^6$  Гц к  $10^5$  Гц), обобщенные показатели жесткости (Н/м), вязкости (Па·с), электропроводность мембран (См/м), индексы деструкции (на разных частотах диапазона) (%) и агрегации (усл. ед.), амплитуду деформации эритроцитов на частоте  $10^6$  Гц (м), степень деформации клеток на частоте  $5 \times 10^5$  Гц (%), емкость мембран эритроцитов (Ф), скорость движения клеток к электродам (мкм/с), положение равновесной частоты (Гц), величину дипольного момента (Кл × м). Для распознавания образа клеток и компьютерной обработки данных использовали пакет оригинальных программ CELLFIND. Ошибка воспроизводимости метода составила 7–12 %.

Статистическая обработка данных проводилась при помощи программы IBM SPSS Statistics (версия 26.0). Перед проведением статистического анализа изучаемые параметры подвергались процедуре нормализации. Характер распределения количественных показателей проверяли критерием Колмогорова-Смирнова. В случае нормального распределения данные представлены в виде средних значений и стандартного отклонения ( $M \pm SD$ ), при отсутствии нормального распределения в виде медианы и 25, 75 % квартилей ( $Me [Q1; Q3]$ ). При сравнении двух нормально распределенных выборок использовался t-тест Стьюдента, при отсутствии нормального распределения применялся непараметрический критерий U-критерий Манна-Уитни. Выявление различий между уровнями электрических, вязкоупругих параметров эритроцитов у пациентов с ЖБП смешанного генеза и лиц группы сравнения обеспечил дискриминантный анализ методом наименьших квадратов (ortho PLS-DA). Связи между признаками оценивались вычислением коэффициента линейной корреляции Пирсона; для интервальных и порядковых переменных, не подчиняющихся нормальному распределению, ранговым коэффициентом корреляции Спирмена. Статистическую значимость различий относительных показателей определяли по критерию  $\chi^2$  Пирсона. Критический уровень значимости определялся при  $p < 0,05$ .

Исследование одобрено Этическим Комитетом Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательского института терапии и профилактической медицины» (протокол заседания № 122 от 29.11.2016). Все обследуемые дали информированное согласие на участие в работе в соответствии с Хельсинской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266.

Клиничко-биохимические показатели пациентов исследуемых групп представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Клиничко-биохимические показатели, параметры красной крови у пациентов с жировой болезнью печени и в группе сравнения ( $M \pm SD$ )

Показатели	Группа сравнения, n = 28	Группа пациентов с ЖБП n = 31	p
Возраст, годы	47,3±14,3	50,6 ± 9,9	0,311
Окружность талии, см	91,8±2,98	115,7±2,6	0,000001

Показатели	Группа сравнения, n = 28	Группа пациентов с ЖБП n = 31	p
Систолическое артериальное давление, мм рт. ст.	122,8±13,75	146,5±20,0	0,00002
Диастолическое артериальное давление, мм рт. ст.	78,5±12,69	90,4±20,5	0,009
Индекс массы тела, кг/м <sup>2</sup>	24,2 ± 12,6	31,6 ± 5,12	0,005
Разовая доза алкоголя (г)	18,1 ± 4,5	103,1 ± 62,86	0,00001
Недельная доза алкоголя (г)	24,6 ± 5,3	211,0 ± 133,8	0,00001
Стаж потребления алкоголя (лет)	—	12,6 ± 5,9	—
Общий холестерин, ммоль/л	4,21 ± 0,81	6,02 ± 1,66	0,000001
Холестерин ЛПВП, ммоль/л	1,40 ± 0,34	1,10 ± 0,31	0,0005
Холестерин ЛПНП, ммоль/л	2,87 ± 0,44	4,28 ± 1,58	0,00001
Триглицериды, ммоль/л	1,71 ± 1,35	3,08 ± 3,17	0,032
Глюкоза крови натощак, ммоль/л	4,6 ± 3,1	7,61 ± 2,65	0,0002
Общий белок, г/л	73,2 ± 10,1	69,4 ± 4,0	0,066
Альбумин, г/л	44,61 ± 4,3	43,6 ± 2,82	0,300
АЛТ, Ед/л	14,8 ± 7,9	27,2 ± 18,1	0,001
АСТ, Ед/л	12,4 ± 6,8	23,1 ± 10,9	0,00002
Коэффициент Де Ритиса (АСТ/АЛТ)	0,87 ± 0,21	0,92 ± 0,08	0,243
ГГТП, Ед/л	15,3 ± 9,5	57,9 ± 46,2	0,000006
ЩФ, Ед/л	125,2 ± 38,6	151,7 ± 56,5	0,038
Общий билирубин, мкмоль/л	12,9 ± 4,7	13,4 ± 8,12	0,771
Прямой билирубин, мкмоль/л	3,6 ± 3,1	3,34 ± 2,24	0,713
Мочевая кислота, мг/дл	171,7 ± 66,1	363,1 ± 66,4	0,00001
Креатинин, мкмоль/л	72,7 ± 14,8	81,6 ± 9,3	0,008
Мочевина, ммоль/л	5,4 ± 7,4	5,41 ± 1,29	0,994
Железо сыворотки, мкмоль/л	10,7 ± 7,9	16,6 ± 6,79	0,003
ОЖСС, мкмоль/л	64,5 ± 2,97	60,0 ± 3,73	0,091
Эластичность печени, кПа	4,47 ± 2,22	5,63 ± 2,56	0,067
Индекс NAFLD liver fat score	-1,78 ± 0,33	2,39 ± 0,58	0,000001
Индекс Саго	0,45 ± 0,04	0,26 ± 0,08	0,038
Количество эритроцитов, × 10 <sup>12</sup> /л	4,62 ± 0,38	4,97 ± 0,45	0,001
Гематокрит, %	42,94 ± 2,62	45,1 ± 4,39	0,024
СО <sub>2</sub> , мм/ч	8,85 ± 3,96	13,65 ± 8,75	0,0077

Пациенты с ЖБП смешанного генеза были сопоставлены с лицами группы сравнения по возрасту, все обследованные

больные имели проявления метаболического синдрома. У них оказались значимо выше окружность талии, индекс массы тела, величины систолического и диастолического артериального давления, уровни показателей липидного профиля — общего холестерина, холестерина ЛПНП, триглицеридов, глюкозы крови натощак, мочевой кислоты, напротив, уровень ХС ЛПВП был ниже, чем в группе контроля (p=0,0005). 28 мужчин с ЖБП (90,3 %) имели избыточную массу тела (8 человек, 25,8 %) или ожирение (по 9 человек 1 и 2 степени (58 %), 2 мужчин (6,5 %) — 3 степени). У 10 (32,3 %) обследуемых диагностирован предиабет, в 9 случаях (29 %) — сахарный диабет 2 типа. Все пациенты с ЖБП систематически потребляли алкогольные напитки с частотой более раза в неделю в большей части случаев (27 человек, 87 %) с разовыми и недельными дозами, статистически значимо большими, чем в группе сравнения (p<0,00001). Величина индекса Саго менее 0,33 свидетельствовала о наличии инсулинорезистентности у всех пациентов с ЖБП. Около трети пациентов потребляли крепкие алкогольные напитки (водка), 8 человек (25,8 %) предпочитали пиво, в 6 (19,4 %) случаях отмечено одномоментное потребление водки и пива; преимущественно вино потребляли 6 человек (в том числе, двое сочетали его с пивом); один пациент сообщил о потреблении алкогольных напитков различной крепости. Средний стаж потребления алкоголя превышал 12 лет.

По данным непрямой эластометрии печени степень фиброза у всех обследованных не превышала 1 степени, по величине эластичности печени в кПа отмечена тенденция к большим величинам при ЖБП, чем в контроле. Значения шкалы содержания жира у пациентов с ЖБП (NAFLD liver fat score), связанной с инсулинорезистентностью, превышающие 0,64, подтверждали наличие стеатоза печени [12].

При анализе печеночных проб выявлены статистически значимо более высокие активности трансаминаз, щелочной фосфатазы, уровни железа сыворотки крови у больных с ЖБП, чем в контроле (p<0,05). Вместе с тем, эти величины находились в границах референтных значений. Лишь активность ГГТП превышала верхнюю границу нормы у пациентов с жировой болезнью печени, отражая факт систематического потребления алкоголя. Отмечена тенденция к снижению уровня общего белка.

Таким образом, среди обследованных пациентов с жировой болезнью печени смешанного генеза преобладали лица с проявлениями метаболического синдрома систематически потребляющие алкоголь в токсических дозах с наличием признаков стеатоза печени или стеатогепатита минимальной биохимической активности с невыраженным фиброзом печени.

Анализируя традиционно используемые показатели красной крови в обследованных группах (таблица 1),

оказалось, что количество эритроцитов ( $p < 0,001$ ), СОЭ ( $p = 0,0077$ ) и гематокрит ( $p = 0,024$ ) были выше у пациентов с ЖБП, чем в контроле. По остальным параметрам группы были сопоставимы.

При сравнении электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов у пациентов жировой болезнью печени смешанного генеза и здоровыми лицами установлено, что клетки красной крови при ЖБП имели меньший диаметр, большую долю сфероцитарных, деформированных клеток при меньшей дискоцитарных ( $p < 0,05$ ) (таблицы 2, 3). Эритроциты пациентов с ЖБП имели меньшую амплитуду деформации на высоких частотах электрического поля, емкость клеток, скорость движения к электродам, дипольный момент, а также более низкие значения поляризуемости на частотах  $10^6$  и  $0,5 \times 10^6$  Гц, относительной поляризуемости, чем лица группы сравнения ( $p < 0,05$ ) (таблицы 2, 3). Напротив, обобщенные показатели вязкости и жесткости, электропроводность, индекс агрегации, деструкции на разных частотах электрического поля, поляризуемость на низких частотах ( $0,1 \times 10^6$ ,  $0,05 \times 10^6$ ) оказались выше, чем у мужчин контрольной группы ( $p < 0,05$ ). Равновесная частота у пациентов с ЖБП оказалась смещенной в высокочастотный диапазон ( $p = 0,003$ ).

Таблица 2.

Электрические и вязкоупругие показатели эритроцитов в группе сравнения и у пациентов с жировой болезнью печени (Me [25 %; 75 %])

Показатели	Группа сравнения, n = 28	Пациенты с ЖБП n = 31	p
Средний диаметр эритроцита, мкм	7,56 [7,54; 7,58]	7,52 [7,50; 7,54]	0,05
Доля дискоцитов, %	76,9 [75,5; 81,4]	67,2 [59,4; 73,5]	0,007
Доля сфероцитов, %	15,1 [10,2; 18,7]	31,7 [24,5; 35,1]	0,0004
Доля деформированных клеток, %	12,4 [10,8; 16,1]	29,1 [23,4; 32,8]	0,0005
Амплитуда деформации на частоте $10^6$ Гц, м	$7,9 \cdot 10^{-6}$ [ $7,3 \cdot 10^{-6}$ ; $8,3 \cdot 10^{-6}$ ]	$6,3 \cdot 10^{-6}$ [ $5,82 \cdot 10^{-6}$ ; $6,57 \cdot 10^{-6}$ ]	0,0001
Степень изменения амплитуды деформации на частоте $0,5 \times 10^6$ Гц, %	72 [68; 76]	40,5 [32,5; 48,8]	0,0001
Обобщенный показатель жесткости, Н/м	$8,11 \cdot 10^{-6}$ [ $7,92 \cdot 10^{-6}$ ; $8,29 \cdot 10^{-6}$ ]	$9,51 \cdot 10^{-6}$ [ $9,25 \cdot 10^{-6}$ ; $9,84 \cdot 10^{-6}$ ]	0,0001
Обобщенный показатель вязкости, Па x с	0,62 [0,58; 0,65]	0,72 [0,71; 0,75]	0,0001

Показатели	Группа сравнения, n = 28	Пациенты с ЖБП n = 31	p
Емкость клеточной мембраны, Ф	$7,19 \cdot 10^{-14}$ [ $6,87 \cdot 10^{-14}$ ; $7,62 \cdot 10^{-14}$ ]	$2,81 \cdot 10^{-14}$ [ $1,45 \cdot 10^{-14}$ ; $4,99 \cdot 10^{-14}$ ]	0,00001
Электропроводность клеток, См/м	$5,48 \cdot 10^{-5}$ [ $5,41 \cdot 10^{-5}$ ; $5,66 \cdot 10^{-5}$ ]	$8,62 \cdot 10^{-5}$ [ $5,69 \cdot 10^{-5}$ ; $9,12 \cdot 10^{-5}$ ]	0,0001
Скорость движения $E_r$ к электродам, мкм/с	5,8 [5,2; 6,3]	3,7 [3,0; 4,2]	0,001
Положение равновесной частоты, Гц	0,47·106 [0,43·106; 0,51·106]	0,81·106 [0,40·106; 1,26·106]	0,003
Дипольный момент, Кл x м	$7,04 \cdot 10^{-21}$ [ $3,42 \cdot 10^{-21}$ ; $7,67 \cdot 10^{-21}$ ]	$4,1 \cdot 10^{-21}$ [ $3,42 \cdot 10^{-21}$ ; $5,1 \cdot 10^{-21}$ ]	0,0001
Индекс агрегации $E_r$ , усл. коэффициент	0,61 [0,58; 0,61]	0,685 [0,64; 0,738]	0,002

Таблица 3.

Уровни индекса деструкции эритроцитов ( $M \pm SD$ ) и показателей поляризуемости в группе сравнения и у пациентов с жировой болезнью печени (Me [25 %; 75 %])

Показатели	Группа сравнения, n = 28	Пациенты с ЖБП n = 31	p
Индекс деструкции $E_r$ на частоте $10^6$ Гц, %	$0,202 \pm 0,211$	$0,474 \pm 1,187$	0,05
Индекс деструкции $E_r$ на частоте $0,5 \times 10^6$ Гц, %	$0,028 \pm 0,118$	$0,538 \pm 1,202$	0,02
Индекс деструкции $E_r$ на частоте $0,1 \times 10^6$ Гц, %	$0,053 \pm 0,201$	$0,661 \pm 1,72$	0,03
Индекс деструкции $E_r$ на частоте $0,5 \times 10^5$ Гц, %	$0,041 \pm 0,297$	$0,448 \pm 1,23$	0,01
Поляризуемость на частоте $10^6$ Гц, м <sup>3</sup>	$3,3 \cdot 10^{-15}$ [ $3,1 \cdot 10^{-15}$ ; $3,6 \cdot 10^{-15}$ ]	$0,886 \cdot 10^{-15}$ [ $0,403 \cdot 10^{-15}$ ; $1,5 \cdot 10^{-15}$ ]	0,00001
Поляризуемость на частоте $0,5 \times 10^6$ Гц, м <sup>3</sup>	$2,9 \cdot 10^{-15}$ [ $2,6 \cdot 10^{-15}$ ; $3,2 \cdot 10^{-15}$ ]	$0,717 \cdot 10^{-15}$ [ $0,432 \cdot 10^{-15}$ ; $1,32 \cdot 10^{-15}$ ]	0,00001
Поляризуемость на частоте $0,1 \times 10^6$ Гц, м <sup>3</sup>	$-3,6 \cdot 10^{-15}$ [ $-3,2 \cdot 10^{-15}$ ; $-4,1 \cdot 10^{-15}$ ]	$-1,45 \cdot 10^{-15}$ [ $-0,756 \cdot 10^{-15}$ ; $-2,12 \cdot 10^{-15}$ ]	0,0001
Поляризуемость на частоте $0,05 \times 10^6$ Гц, м <sup>3</sup>	$-2,8 \cdot 10^{-15}$ [ $-2,5 \cdot 10^{-15}$ ; $-3,3 \cdot 10^{-15}$ ]	$-0,864 \cdot 10^{-15}$ [ $-0,528 \cdot 10^{-15}$ ; $-1,71 \cdot 10^{-15}$ ]	0,0001
Относительная поляризуемость	1,27 [0,88; 1,51]	0,635 [0,293; 1,362]	0,001

На частоте  $10^6$  Гц индекс деструкции от 1,6 до 4,5 % зарегистрирован у 5 больных (16,1 %), на частоте  $0,5 \times 10^6$  Гц уровень гемолиза от 1,5 до 4,5 % наблюдался у 6 человек (19,4 %). На низких частотах электрического поля уровень гемолиза был выше — на частоте  $0,1 \times 10^6$  Гц от 1,4 до 8,5 % у шести мужчин (19,4 %); на частоте  $0,5 \times 10^5$  Гц лизис клеток на уровне от 2,4 до 5 % был установлен у 4 человек (12,9 %).

Проведенный дискриминантный анализ (ortho PLS-DA) позволил подтвердить выявленные различия в уровнях электрических, вязкоупругих параметров эритроцитов у пациентов с ЖБП смешанного генеза и в группе сравнения (рисунок 1).

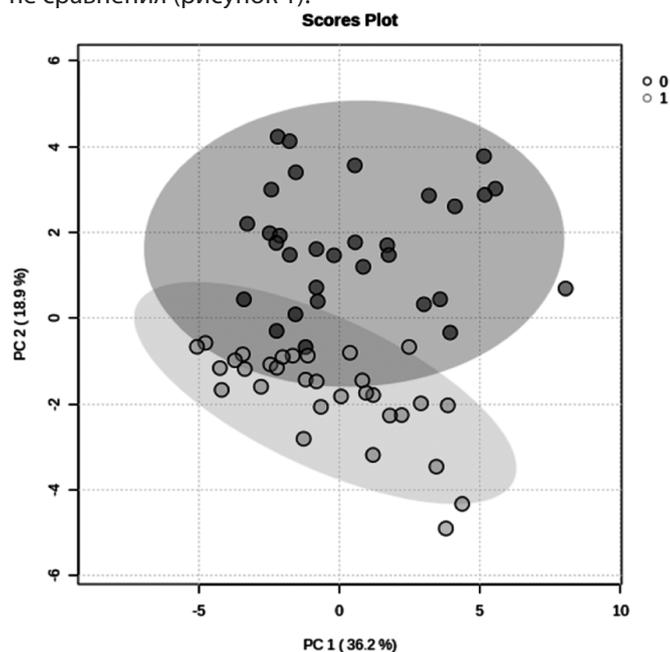


Рис. 1. Метод ortho PLSDA в различении электрических и вязкоупругих показателей эритроцитов (непарная статистика) у пациентов с жировой болезнью печени смешанного генеза (темное облако, темные точки) и лиц группы сравнения (светлое облако, светлые точки)

Корреляционный анализ выявил обилие ассоциаций между биохимическими показателями и электрическими, вязкоупругими параметрами эритроцитов. С характеристиками липидного профиля, в частности, с уровнем общего холестерина (ОХС) и холестерина ЛПНП (ХС ЛПНП) оказались ассоциированы параметры эритроцитов, отражающие уровень поверхностного заряда клеток (скорость движения клеток к электродам — ОХС  $r=-0,418$ ,  $p=0,019$ ; ХС ЛПНП  $r=-0,481$ ,  $p=0,011$ ; дипольный момент — ОХС  $r=-0,412$ ,  $p=0,002$ , ХС ЛПНП  $r=-0,417$ ,  $p=0,011$ ), резистентность эритроцитов (поляризуемость на частоте  $0,5 \times 10^6$  Гц — ХС ЛПНП  $r=-0,326$ ,  $p=0,047$ ; относительная поляризуемость — ОХС  $r=-0,420$ ,  $p=0,023$ , ХС ЛПНП  $r=-0,421$ ,  $p=0,029$ ), вязкоупругие параметры клетки (обобщенный показатель жесткости — ОХС

$r=0,383$ ,  $p=0,034$ ; обобщенный показатель вязкости — ОХС  $r=0,366$ ,  $p=0,043$ ; доля дискоцитов — ОХС  $r=-0,451$ ,  $p=0,011$ ). Уровень ХС ЛПВП имел ассоциации обратной направленности, по сравнению уровнем ОХС, с долей дискоцитов ( $r=0,500$ ,  $p=0,004$ ) и величиной дипольного момента ( $r=0,387$ ,  $p=0,04$ ). Уровень ХС ЛПВП был ассоциирован с показателем емкости, отражающим структуры мембран ( $r=0,308$ ,  $p=0,05$ ).

С показателями синдрома цитолиза (трансаминазы, билирубин) более тесные связи установлены для поляризуемости клеток на разных частотах электрического поля, электропроводности, емкости мембран эритроцитов. Установлены корреляции активности АЛТ с поляризуемостью на частоте  $0,5 \times 10^6$  Гц ( $r=-0,357$ ,  $p=0,053$ ), на частоте  $0,05 \times 10^6$  Гц ( $r=0,424$ ,  $p=0,022$ ), с емкостью мембраны ( $r=-0,310$ ,  $p=0,059$ ), со скоростью движения эритроцитов ( $r=-0,323$ ,  $p=0,056$ ), положением равновесной частоты ( $r=0,365$ ,  $p=0,05$ ), с дипольным моментом ( $r=-0,309$ ,  $p=0,03$ ), с обобщенным показателем вязкости ( $r=0,308$ ,  $p=0,052$ ). Активность ЩФ ассоциирована с поляризуемостью на частоте  $10^6$  Гц ( $r=-0,438$ ,  $p=0,014$ ), на частоте  $0,1 \times 10^6$  Гц ( $r=0,386$ ,  $p=0,039$ ), с дипольным моментом ( $r=-0,353$ ,  $p=0,023$ ). Уровень общего и прямого билирубина был связан с долей деформированных клеток ( $r=0,366$ ,  $p=0,043$  и  $r=0,365$ ,  $p=0,05$ ), общего билирубина — с электропроводностью клеток ( $r=0,339$ ,  $p=0,052$ ), с величиной дипольного момента ( $r=-0,417$ ,  $p=0,01$ ). Показатель белок-синтетической функции печени — уровень общего белка — показал корреляции с долей дискоцитов ( $r=0,330$ ,  $p=0,067$ ), поляризуемостью на частоте  $10^6$  Гц ( $r=0,404$ ,  $p=0,024$ ), на частоте  $0,05 \times 10^6$  Гц ( $r=-0,386$ ,  $p=0,039$ ). Уровень альбумина оказался ассоциирован с поляризуемостью на частоте  $0,1 \times 10^6$  Гц ( $r=-0,339$ ,  $p=0,052$ ), электропроводностью клеток ( $r=-0,463$ ,  $p=0,01$ ), емкостью клеточной мембраны ( $r=0,363$ ,  $p=0,053$ ). Уровень мочевой кислоты продемонстрировал ассоциации с вязкоупругими характеристиками эритроцитов: прямые — с обобщенными показателями вязкости ( $r=0,419$ ,  $p=0,019$ ), жесткости ( $r=0,369$ ,  $p=0,041$ ), обратные — с амплитудой деформации ( $r=-0,327$ ,  $p=0,053$ ), и поляризуемостью на частоте  $10^6$  Гц ( $r=-0,352$ ,  $p=0,052$ ). Уровень креатинина оказался связанным с обобщенными показателями вязкости ( $r=0,336$ ,  $p=0,054$ ), жесткости ( $r=0,457$ ,  $p=0,01$ ), с амплитудой деформации ( $r=-0,457$ ,  $p=0,01$ ) и положением равновесной частоты ( $r=0,406$ ,  $p=0,029$ ). Обнаружены корреляции уровня мочевины с поляризуемостью на частоте  $10^6$  Гц ( $r=-0,373$ ,  $p=0,042$ ), на частоте  $0,5 \times 10^6$  Гц ( $r=-0,385$ ,  $p=0,039$ ). Показатель ОЖСС демонстрировал сильные корреляции с показателями вязкости ( $r=-0,758$ ,  $p=0,003$ ), жесткости ( $r=-0,609$ ,  $p=0,027$ ), с амплитудой деформации ( $r=0,609$ ,  $p=0,027$ ).

Степень гемолиза эритроцитов на частоте  $0,5 \times 10^6$  Гц обратно коррелировала с уровнем глюкозы натощак

( $r=-0,518$ ,  $p=0,004$ ) и прямо — с крепостью потребляемого алкогольного напитка ( $r=0,449$ ,  $p=0,014$ ). Уровень гемолиза на низкой частоте  $0,1 \times 10^6$  Гц был обратно связан с уровнями гемоглобина ( $r=-0,372$ ,  $p=0,043$ ), гематокрита ( $r=-0,326$ ,  $p=0,05$ ) и прямо — с величиной RDW-CV ( $r=0,368$ ,  $p=0,045$ ). Доля дискоцитов оказалась прямо ассоциирована с количеством эритроцитов ( $r=0,409$ ,  $p=0,022$ ), уровнем гемоглобина ( $r=0,452$ ,  $p=0,011$ ), гематокрита ( $r=0,415$ ,  $p=0,02$ ) и обратно — с RDW-CV ( $r=-0,493$ ,  $p=0,005$ ). Величина электропроводности прямо коррелировала с СОЭ ( $r=0,375$ ,  $p=0,038$ ), а поляризуемость — с величиной цветового показателя (на частоте  $0,1 \times 10^6$  Гц  $r=-0,411$ ,  $p=0,027$ , относительная поляризуемость —  $r=0,413$ ,  $p=0,026$ ), а также со значением MCHC (на частоте  $0,05 \times 10^6$  Гц  $r=-0,342$ ,  $p=0,059$ ). Уровень поляризуемости на частоте  $0,1 \times 10^6$  Гц оказался связанным с показателями стиля потребления алкоголя — с разовой дозой ( $r=0,314$ ,  $p=0,047$ ), стажем систематического приема алкоголя ( $r=0,396$ ,  $p=0,034$ ).

Для исследования параметров клеток красной крови у пациентов с жировой болезнью печени смешанного генеза использован метод диэлектрофореза, оценивающий воздействие на эритроциты неоднородного переменного электрического поля с разными частотами, что позволяет моделировать влияние стресса различной интенсивности [8, 14]. Ряд параметров (скорость движения клеток к электродам, дипольный момент, индекс агрегации, доля деформированных клеток) ассоциирован с величиной отрицательного поверхностного заряда эритроцитов. Состояние мембран клеток характеризуют электропроводность и емкость клеток. Перечень характеристик отражает функциональный потенциал эритроцитов, включая состояние мембран и внутреннего содержимого эритроцита (амплитуда деформации, обобщенные показатели вязкости, жесткости). Наконец, часть показателей дает возможность анализировать резистентность клеток красной крови и способность к адаптации (поляризуемость, индексы деструкции) [14]. В проведенных ранее исследованиях показана высокая чувствительность метода диэлектрофореза к выявлению реакций эритроцитов на воздействие различных факторов, включая вирусы, бактерии, наночастицы, химические соединения [14]. Преимуществом предложенного подхода является раннее выявление изменений эритроцитов по сравнению с рутинными индексами.

В нашем исследовании выявлено, что эритроциты пациентов с жировой болезнью печени смешанного генеза отличаются от клеток лиц группы сравнения меньшим поверхностным зарядом (сниженные скорость движения клеток к электродам, дипольный момент, повышенный индекс агрегации, смещение равновесной частоты в высокочастотный диапазон), более низкой способностью к деформации (сниженные величины амплитуды деформации на высоких частотах электрического поля

при повышенных обобщенных показателях вязкости, жесткости), повышенной способностью утолщенной мембраны проводить электрический ток (повышенная электропроводность на фоне сниженной емкости клеток), сниженной резистентностью (более низкие уровни поляризуемости на высоких частотах, относительной поляризуемости, повышенные индексы деструкции) ( $p<0,05$ ).

У пациентов с жировой болезнью печени смешанного генеза проявления метаболического синдрома потенцируются систематическим потреблением алкоголя в токсических дозах, что, вероятно, в большей степени влияет на состояние клеток красной крови, чем метаболические нарушения и алкоголизация по отдельности. Вместе с тем, большие сдвиги в структурно-функциональных параметрах эритроцитов ассоциированы с утяжелением течения жировой болезни печени. В исследовании Dai X. et al. было показано, что количество эритроцитов было связано с повышенным риском развития метаболически-ассоциированной жировой болезни печени, и эта связь не зависела от возраста, расы, ИМТ и других значимых факторов [15]. Zhong F. et al. показали связь между числом эритроцитов и тяжестью, а также прогрессированием жировой болезни печени [16]. Результаты настоящей работы с выявлением достоверно большего количества эритроцитов у пациентов с ЖБП согласуются с данными этих исследований.

Одним из ключевых механизмов возникновения МАЖБП является резистентность к инсулину. Инсулинорезистентность является общей патофизиологической основой метаболических нарушений, включая ожирение, сахарный диабет 2 типа, гипертонию, дислипидемию и метаболический синдром [17]. Barbieri et al. представили *in vivo* доказательства взаимосвязи между инсулинорезистентностью и количеством эритроцитов [18]. Несколько исследований также показали, что резистентность к инсулину связана с повышенной степенью агрегации эритроцитов [19]. В ряде работ представлены данные, что эритроциты являются основным источником сфингозин 1-фосфата (S1P) плазмы — внутриклеточного биолипида, реагирующего на тканевую гипоксию путем усиления гликолиза эритроцитов и доставки кислорода [20]. При развитии метаболически-ассоциированной жировой болезни печени возникает микросреда гипоксии, в которой накопление липидов в кровеносных сосудах и печени приводит к ограничению кровоснабжения гепатоцитов, что указывает на возможную роль S1P в данном процессе [21]. Также было показано, что S1P связан с резистентностью к инсулину, гиперлипидемией и воспалением [22]. Сообщалось, что активация пути SphK1/S1P/S1P2R может ингибировать петлю обратной связи секреции инсулина и чувствительности к нему [23]. Экспериментальные исследования на животных и на людях выявили положительную корреляцию между S1P плазмы

и уровнем холестерина ЛПНП, демонстрируя значимую функцию S1P в условиях гиперлипидемии [24]. Более того, воспаление играет важную роль в прогрессировании жировой болезни печени. Согласно нескольким сообщениям, S1P активирует S1PR2, предотвращая миграцию макрофагов в область воспаления [20]. Следует отметить, что при НАЖБП обнаруживается измененный липидный профиль мембран эритроцитов [7], подразумевая, что изменения количества и состава липидов в мембране эритроцитов могут оказывать влияние на патогенез и развитие стеатоза или стеатогепатита [25]. Кроме того, также была обнаружена взаимосвязь между составом жирных кислот мембран и резистентностью к инсулину [26].

Выявленные в настоящем исследовании изменения морфологических параметров эритроцитов — увеличение сфероцитарных, деформированных форм клеток, вероятно, связаны с гипергликемией, с аномальным липидным профилем плазмы и повышенной концентрацией перекисей липидов [27]. Показано, что при наличии сахарного диабета скорость поглощения глюкозы, активность ферментов, а также выработка и утилизация промежуточных метаболитов и АТФ в эритроцитах пациентов существенно изменены, что, в том числе, влияет на морфологию клеток [28, 29]. Кроме того, очевидно, влияние систематически потребляемого алкоголя. Так, в исследовании Lee SY et al. установлено повышение уровня сферичности клеток под воздействием даже умеренных доз этанола на эритроциты [30].

Известно, что деформируемость эритроцитов определяется механическими свойствами внешней части клеточной мембраны, вязкостью цитоплазмы клетки и отношением ее объема к площади поверхности [31]. Механические свойства (модуль сдвига, модуль изгиба и модуль расширения площади) мембраны эритроцитов определяются ее спектриновой сетью, составом липидной части мембраны и формой эритроцитов. Вязкость цитоплазмы клетки в первую очередь определяется концентрацией гемоглобина и особенностями его структуры [32, 33]. Отклонения от нормальной двояковогнутой формы, уменьшенное отношение площади к объему, более высокий модуль сдвига мембраны и ее вязкость или повышенная вязкость цитоплазмы, как правило, снижают деформируемость.

Снижение способности эритроцитов к деформации с повышением обобщенных жесткости и вязкости может быть обусловлено усиленным гликозилированием мембран эритроцитов и гемоглобина на фоне гипергликемии [34], которая была выявлена у пациентов с ЖБП в нашей работе. Измененная молекулярная архитектура липидного бислоя мембраны эритроцитов [35], снижение текучести мембран клеток, вызванное увеличением неферментативного гликозилирования, активных

форм кислорода и перекисного окисления липидов [36] также ассоциируют со снижением способности клеток к деформации. Babu N. et al. показали значимость дислипидемии для деформируемости клеток [37]. Очевидно, данный фактор также мог повлиять на амплитуду деформации эритроцитов у пациентов с ЖБП. Shin S. et al. продемонстрировали, что снижение деформируемости эритроцитов сокращает продолжительность жизни клеток, а агрегация разрушенных эритроцитов в микросудах затрудняет кровоток, что в конечном итоге приводит к гипоксии в тканях организма, включая печень [38]. Кроме того, Weuckamp C. показал, что гликозилированный гемоглобин (HbA1c) обладает повышенным сродством к  $O_2$ ; следовательно, более высокие концентрации HbA1c у пациентов с гипергликемией приводят к трудностям с выделением кислорода клеткам и снижению кислород-транспортирующей функции эритроцитов [39]. Оксид азота (NO), вырабатываемый эритроцитами, участвует в деформации клеток на микроциркуляторном уровне, а снижение биодоступности NO в клетках красной крови приводит к снижению их деформируемости и повышенной адгезии, что ассоциировано с нарушениями микроциркуляции [40, 41].

Существенно влияет на способность эритроцитов к деформации и алкоголь. Исследования, проведенные с использованием фильтрации через микропоры, показали, что деформируемость эритроцитов снижается у систематически потребляющих алкоголь [42]. С одной стороны, этанол и его метаболит — ацетальдегид существенно изменяют структуру мембран эритроцитов — усиление перекисного окисления липидов приводит к уменьшению цис-двойных связей в жирно-кислотных остатках фосфолипидов, в ходе чего увеличивается число упорядоченных участков в мембране эритроцитов [43]. Установлено увеличение соотношения холестерина/фосфолипиды в мембранах эритроцитов для обеспечения устойчивости к разжижающему эффекту этанола у систематически потребляющих этанол. Кроме того, происходит изменение соотношения фракций фосфолипидов со снижением легкоокисляемых (фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина и др.) и повышением лизофракций [43]. Воздействие этанола на мембранные белки, гликаны ассоциировано со снижением активности мембраносвязанных ферментов, которая также зависит от липидного микроокружения —  $Ca^{2+}$ -насоса,  $Na^+/K^+$ -АТФазы. В результате в эритроцитах возрастает концентрация ионов  $Ca^{2+}$ , что приводит к агрегации молекул спектрина, локализованного на цитоплазматической поверхности мембраны, снижению уровня АТФ в клетках [44, 45]. Значительные сдвиги в структуре мембран эритроцитов у систематически потребляющих алкоголь являются одной из причин их сниженной деформируемости [46]. С другой стороны, этанол и ацетальдегид существенно влияют на структуру гемоглобина, повышая его вязкость из-за агрегации молекул в результате ис-

тощения АТФ, аккумуляции внутриклеточного кальция [30]. В условиях дефицита восстановленного глутатиона воздействие активных форм кислорода может способствовать образованию спектрин-гемоглобиновых ассоциатов, а также усиливать аутоокисление гемоглобина [47]. Вышеописанные факторы, вероятно, вносят вклад в повышение обобщенных показателей вязкости, жесткости и снижение амплитуды деформации у пациентов с жировой болезнью печени смешанного генеза. Существенная модификация структуры мембран, вероятно, ассоциирована с повышением способности проводить электрический ток, изменением ее емкости. Следует учитывать и воздействие на мембрану эритроцитов сывороточных компонентов — липидных (холестерина, липопротеинов), белковых (фибриногена, С-реактивного протеина, гамма-глобулинов), изменяющих толщину мембраны, ее свойства и снижающих отрицательный поверхностный заряд эритроцитов [48].

Показано, что повышенная сферичность эритроцитов из-за потери площади поверхности при потреблении даже умеренных доз этанола может ухудшить деформируемость клеток [30].

Обнаруженные признаки снижения поверхностного заряда эритроцитов у пациентов с ЖБП смешанного генеза, вероятно, обусловлены рядом причин. Показано, что у пациентов с сахарным диабетом снижается общее содержание белка (в частности, гликопротеинов) в мембране эритроцитов, тогда как активность сиалидазы повышается, что, в свою очередь, уменьшает содержание сиаловых кислот на поверхности клеток. В результате поверхностный отрицательный заряд клеток красной крови уменьшается, а агрегация эритроцитов увеличивается [49]. Повышенная агрегация и адгезия затрудняют разделение агрегированных эритроцитов на отдельные клетки, когда кровь течет с высокой скоростью сдвига. Эритроциты в составе агрегатов закупоривают кровеносные сосуды, вызывают недостаточную перфузию, местную ишемию тканей и гипоксию, что серьезно влияет на кровоток и транспорт кислорода, являясь триггером фиброгенеза в печени.

Гипергликемия также снижает антиоксидантную способность за счет снижения уровней антиоксидантов в тканях, таких как витамин Е, глутатион, каталаза и супероксиддисмутаза [50]. У больных сахарным диабетом наблюдается высокая степень окислительного стресса, а антиоксидантная способность эритроцитов снижена [51]. Эритроциты уязвимы к окислительному стрессу, и окисление структурных белков (таких как цитоскелеты и мембранные белки) и функциональных белков (таких как ферменты) может дополнительно влиять на функцию клеток [52]. Деформируемость эритроцитов, поврежденных окислительным стрессом, значительно снижается, что затрудняет прохождение эритроцитов через микрососуды.

Гипергликемия, повышенный осмос и окислительный стресс у пациентов с сахарным диабетом изменяют концентрацию железа и белка внутри и снаружи эритроцитов, а затем активируют путь эриптоза [53]. У пациентов с сахарным диабетом основные механизмы эриптоза включают воздействие ионов кальция, фактора активации тромбоцитов и каспазный путь; эти патогенетические направления взаимодействуют друг с другом [53–55]. Вышеописанные обстоятельства определяют снижение резистентности клеток, уменьшенные уровни поляризуемости на высоких частотах электрического поля и склонность к гемолизу эритроцитов, выявленные у пациентов с ЖБП в настоящей работе.

Систематическое потребление алкоголя усугубляет сдвиги в структурно-функциональных параметрах эритроцитов. Этанол снижает уровни сиаловых и нейраминных кислот мембран эритроцитов, которые определяют большую часть заряда клеток [56]. С уровнем сиаловых кислот связана и резистентность эритроцитов [57]. Снижение поверхностного дзета-потенциала эритроцитов, возможно, связано и с уменьшением уровня калия внутри клетки вследствие инактивации пентозного пути при хроническом воздействии этанола [58], а также с количественными и качественными изменениями компонентов суспензионной среды (плазмы) [59]. Действие ацетальдегида на фермент пентозофосфатного пути глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу эритроцита приводит к нарушению образования восстановленного глутатиона, а поэтому происходит снижение антиоксидантной защиты [60]. Проявлением этого является повышенный гемолиз эритроцитов, который Bulle S. et al. связали также с повышенным окислением липидов и белков, измененным соотношением холестерин/фосфолипиды и измененным профилем белков мембранного цитоскелета эритроцитов [61].

Выявленные корреляции электрических, вязкоупругих параметров эритроцитов с биохимическими показателями, с одной стороны, являются отражением взаимодействий между эритроцитами и компонентами сыворотки крови (включая, липопротеины, белки), которые могут влиять на уровень поверхностного заряда клеток, модифицировать электрические, вязкоупругие параметры мембран эритроцитов [62]. С другой стороны, показано, что гемолиз эритроцитов ассоциирован с повышением активности трансаминаз, билирубина [63]. Ассоциации уровней параметров клеток красной крови с традиционными эритроцитарными показателями, вероятно, отражают сходные или инверсные тренды их изменений. Выявленные связи ряда характеристик эритроцитов с аспектами стиля потребления алкоголя подтверждают возможности метода диэлектрофореза регистрировать изменения эритроцитов, связанные с воздействием внешних агентов, в частности, этанола [14].

Таким образом, пациенты с жировой болезнью печени смешанного генеза (метаболический + алкогольный) по сравнению с группой контроля имели эритроциты меньшего диаметра ( $p < 0,05$ ), с большей долей сфероцитарных ( $p = 0,0004$ ), деформированных форм ( $p = 0,0005$ ) с меньшей способностью к деформации ( $p < 0,0001$ ), более высокими обобщенными показателями вязкости ( $p < 0,0001$ ), жесткости ( $p < 0,0001$ ). Клетки красной крови пациентов с ЖБП имели более низкий поверхностный заряд, отражаемый более низкими величинами скорости движения клеток к электродам ( $p < 0,001$ ), дипольного момента ( $p < 0,0001$ ), более высоким индексом агрегации ( $p = 0,002$ ). Мембраны эритроцитов при ЖБП обладали более высокой способностью проводить электрический ток ( $p < 0,0001$ ), более низкой емкостью ( $p < 0,0001$ ). При ЖБП смешанного генеза сниженная резистентность эритроцитов ассоциирована с более низкими уровнями поляризуемости на высоких частотах электрического поля, а также склонностью к гемолизу ( $p = 0,01$ ). Равно-

весная частота при ЖБП сдвинута в высокочастотный диапазон ( $p = 0,0003$ ).

Широкий спектр характеристик эритроцитов достоверно изменен у пациентов с ЖБП, отмечены взаимосвязи с липидными нарушениями. Установлены корреляции уровней электрических, вязкоупругих параметров эритроцитов с биохимическими показателями, отражающими проявление метаболического синдрома, нарушения функции печени, и с показателями стиля потребления алкоголя, что, вероятно, отражает потенцирующий эффект двух этиологических факторов на клетки красной крови.

Выявленные особенности электрических, вязкоупругих параметров эритроцитов у пациентов с ЖБП смешанного генеза (метаболический + алкогольный) следует считать перспективными в качестве биомаркеров данной патологии и таргетов для терапевтических воздействий.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Ивашкин В.Т., Драпкина О.М., Маев И.В., Трухманов А.С., Блинов Д.В., Пальгова Л.К., Цуканов В.В., Ушакова Т.И. Распространенность неалкогольной жировой болезни печени у пациентов амбулаторно-поликлинической практики в Российской Федерации: результаты исследования DIREG 2. Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2015; 6: 31–41.
- McCullough A.J. Epidemiology of the metabolic syndrome in the USA. *Journal of Digestive Diseases*. 2011; 12(5): 333–340.
- Eslam M, Newsome PN, Sarin SK, et al. A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: An international expert consensus statement. *J Hepatol*. 2020;73(1):202–9. doi:10.1016/j.jhep.2020.03.039
- Balmer M.L., Dufour J.F. Non-alcoholic steatohepatitis — from NAFLD to MAFLD. *Ther. Umsch*. 2011; 68(4): 183–188.
- Подымова С.Д. Болезни печени: Руководство для врачей. Изд. 5-е, перераб. и доп. М: ООО «Медицинское информационное агентство», 2018. 984 с.
- Shiraishi K, Matsuzaki S, Itakura M, Ishida H. Abnormality in membrane fatty acid compositions of cells measured on erythrocyte in alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res*. 1996 Feb;20(1 Suppl):56A–59A. doi: 10.1111/j.1530-0277.1996.tb01730.x.
- Кручинина М.В., Паруликова М.В., Першина Н.Е., Кручинина Э.В. Жирные кислоты мембран эритроцитов как биомаркеры неалкогольной жировой болезни печени у мужчин. *Атеросклероз*, 2022; 18 (4): 362–380. doi: 10.52727/2078-256X-2022-18-4-362-380
- Kruchinina M., Kurilovich S., Gromov A., Generalov V. and Kruchinin V. (2016) Peculiarities of Erythrocytic Parameters in Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis. *Journal of Analytical Sciences, Methods and Instrumentation*, 6, 6–14. doi: 10.4236/jasmi.2016.61002.
- Papadopoulos C, Tentes I, Anagnostopoulos K. Red Blood Cell Dysfunction in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Marker and Mediator of Molecular Mechanisms. *Maedica (Bucur)*. 2020;15(4):513–516. doi: 10.26574/maedica.2020.15.4.513.
- Papadopoulos C, Mimidis K, Papazoglou D, Kolios G, Tentes I, Anagnostopoulos K. Red Blood Cell-Conditioned Media from Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Patients Contain Increased MCP1 and Induce TNF- $\alpha$  Release. *Rep Biochem Mol Biol*. 2022;11(1):54–62. doi: 10.52547/rbmb.11.1.54.
- Рекомендации экспертов ВНОК по диагностике и лечению метаболического синдрома (второй пересмотр). Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2009; 6(2).
- Khang A.R., Lee H.W., Yi D.W. et al. The fatty liver index, a simple and useful predictor of metabolic syndrome: analysis of the Korea National Health and Nutrition Examination Survey 2010–2011. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2019; 12: 181–190 <https://doi.org/10.2147/DMSO.S189544>
- Ивашкин В.Т., Маевская М.В., Павлов Ч.С., Тихонов И.Н., Широкова Е.Н., Буеверов А.О., Драпкина О.М., Шульпекова Ю.О., Цуканов В.В., Маммаев С.Н., Маев И.В., Пальгова Л.К. Клинические рекомендации по диагностике и лечению неалкогольной жировой болезни печени Российского общества по изучению печени и Российской гастроэнтерологической ассоциации. Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2016; 26(2): 24–42. <https://doi.org/10.22416/1382-4376-2016-26-2-24-42>.
- Генералов В.М., Кручинина М.В., Дурыманов А.Г., Медведев А.А., Сафатов А.С., Сергеев А.Н., Буряк Г.А., Курилович С.А., Громов А.А. Диэлектрофорез в диагностике инфекционных и неинфекционных заболеваний. Новосибирск: «ЦЭРИС»; 2011. — 172 с.
- Dai X, Zhou G, Xu L. Associations between red blood cell count and metabolic dysfunction-associated fatty liver disease (MAFLD). *PLoS One*. 2022;17(12):e0279274. doi: 10.1371/journal.pone.0279274.
- Zhong F, Guan L, Lin H, Zhao M, Qin Y, Li Q, Yuan Z, Yang G, Gao L., Zhao J (2021) Red Blood Cell Count: An Unrecognized Risk Factor for Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Front. Endocrinol*. 12:760981. doi: 10.3389/fendo.2021.760981
- Sakurai Y, Kubota N, Yamauchi T, Kadowaki T. Role of Insulin Resistance in MAFLD. *Int J Mol Sci*. 2021;22(8). doi: 10.3390/ijms22084156.

18. Barbieri M, Ragno E, Benvenuti E, Zito GA, Corsi A, Ferrucci L, et al. New aspects of the insulin resistance syndrome: impact on haematological parameters. *Diabetologia*. 2001;44(10):1232–7. doi: 10.1007/s001250100634.
19. Gyawali P, Richards RS, Hughes DL, Tinley P. Erythrocyte aggregation and metabolic syndrome. *Clinical hemorheology and microcirculation*. 2014;57(1):73–83. doi: 10.3233/CH-131792.
20. Tsai HC, Han MH. Sphingosine-1-Phosphate (S1P) and S1P Signaling Pathway: Therapeutic Targets in Autoimmunity and Inflammation. *Drugs*. 2016;76(11):1067–79. doi: 10.1007/s40265-016-0603-2.
21. Chen J, Chen J, Fu H, Li Y, Wang L, Luo S, et al. Hypoxia exacerbates nonalcoholic fatty liver disease via the HIF-2 $\alpha$ /PPAR $\alpha$  pathway. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2019;317(4):E710–e22. doi: 10.1152/ajpendo.00052.2019.
22. Chen W, Lu H, Yang J, Xiang H, Peng H. Sphingosine 1-phosphate in metabolic syndrome (Review). *International journal of molecular medicine*. 2016;38(4):1030–8. doi: 10.3892/ijmm.2016.2731.
23. Fayyaz S, Henkel J, Japtok L, Krämer S, Damm G, Seehofer D, et al. Involvement of sphingosine 1-phosphate in palmitate-induced insulin resistance of hepatocytes via the S1P2 receptor subtype. *Diabetologia*. 2014;57(2):373–82. doi: 10.1007/s00125-013-3123-6.
24. Tong X, Peng H, Liu D, Ji L, Niu C, Ren J, et al. High-density lipoprotein of patients with type 2 diabetes mellitus upregulates cyclooxygenase-2 expression and prostacyclin I-2 release in endothelial cells: relationship with HDL-associated sphingosine-1-phosphate. *Cardiovascular diabetology*. 2013;12:27. doi: 10.1186/1475-2840-12-27
25. Notarnicola M, Caruso MG, Tutino V, Bonfiglio C, Cozzolongo R, Giannuzzi V, et al. Significant decrease of saturation index in erythrocytes membrane from subjects with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Lipids in health and disease*. 2017;16(1):160. doi: 10.1186/s12944-017-0552-0.
26. Bigornia SJ, Lichtenstein AH, Harris WS, Tucker KL. Associations of erythrocyte fatty acid patterns with insulin resistance. *The American journal of clinical nutrition*. 2016;103(3):902–9. doi: 10.3945/ajcn.115.123604.
27. Cimbaljević B., Vasilijević A., Cimbaljević S., et al. Interrelationship of antioxidative status, lipid peroxidation, and lipid profile in insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetic patients. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2007;85(10):997–1003. doi: 10.1139/Y07-088.
28. Radosinska J., Vrbjar N. The Role of Red Blood Cell Deformability and Na, K-ATPase Function in Selected Risk Factors of Cardiovascular Diseases in Humans: Focus on Hypertension, Diabetes Mellitus and Hypercholesterolemia. *Physiological Research*. 2016;65 Suppl 1(Supplement 1): S43–S54. doi: 10.33549/physiolres.933402.
29. Wang Y, Yang P, Yan Z, Liu Z, Ma Q, Zhang Z, Wang Y, Su Y. The Relationship between Erythrocytes and Diabetes Mellitus. *J Diabetes Res*. 2021;6656062. doi: 10.1155/2021/6656062.
30. Lee SY, Park HJ, Best-Popescu C, Jang S, Park YK. The Effects of Ethanol on the Morphological and Biochemical Properties of Individual Human Red Blood Cells. *PLoS One*. 2015;10(12):e0145327. doi: 10.1371/journal.pone.0145327.
31. Vent-Schmidt J, Waltz X, Romana M, Hardy-Dessources M-D, Lemonne N, Billaud M, et al. Blood thixotropy in patients with sickle cell anaemia: role of haematocrit and red blood cell rheological properties. *PLoS One*. 2014;9(12):e114412. doi: 10.1371/journal.pone.0114412.
32. Mohandas N, Chasis J, editors. Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids. *Seminars in hematology*; 1993.
33. Chien S. Red cell deformability and its relevance to blood flow. *Annual review of physiology*. 1987;49(1):177–92.
34. Loyola-Leyva A., Loyola-Rodríguez J.P., Atzori M., González F.J. Morphological changes in erythrocytes of people with type 2 diabetes mellitus evaluated with atomic force microscopy: A brief review. *Micron*. 2018;105:11–17. doi: 10.1016/j.micron.2017.11.001.
35. Sailaja Y.R., Baskar R., Srinivas Rao C.S., Saralakumari D. Membrane lipids and protein-bound carbohydrates status during the maturation of reticulocytes to erythrocytes in type 2 diabetics. *Clinica Chimica Acta*. 2004;341(1–2):185–192. doi: 10.1016/j.cccn.2003.12.003.
36. Bianchetti G., Viti L., Scupola A., et al. Erythrocyte membrane fluidity as a marker of diabetic retinopathy in type 1 diabetes mellitus. *European Journal of Clinical Investigation*. 2020;e13455 doi: 10.1111/eci.13455.
37. Babu N. Influence of hypercholesterolemia on deformability and shape parameters of erythrocytes in hyperglycemic subjects. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. 2009;41(3):169–177. doi: 10.3233/CH-2009-1165.
38. Shin S., Ku Y., Babu N., Singh M. Erythrocyte deformability and its variation in diabetes mellitus. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2007;45(1):121–128.
39. Weykamp C. HbA1c: a review of analytical and clinical aspects. *Annals of Laboratory Medicine*. 2013;33(6):393–400. doi: 10.3343/alm.2013.33.6.393.
40. Bakhtiar N., Hosseinkhani S., Larijani B., Mohajeri-Tehrani M.R., Fallah A. Red blood cell ATP/ADP & nitric oxide: The best vasodilators in diabetic patients. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*. 2012;11(1) doi: 10.1186/2251-6581-11-9.
41. Contreras-Zentella M.L., Sánchez-Sevilla L., Suárez-Cuenca J.A., et al. The role of oxidant stress and gender in the erythrocyte arginine metabolism and ammonia management in patients with type 2 diabetes. *PLoS One*. 2019;14(7):p. e0219481. doi: 10.1371/journal.pone.0219481.
42. Beaugé F, Niel E, Hispard E, Perrotin R, Thepot V, Boynard M, Nalpas B. Red blood cell deformability and alcohol dependence in humans. *Alcohol Alcohol*. 1994; 29:59–63.
43. Lindi C, Montorfano G, Marciani P. Rat erythrocyte susceptibility to lipid peroxidation after chronic ethanol intake. *Alcohol*. 1998;16(4):311–6. doi: 10.1016/s0741-8329(98)00020-2.
44. Pozos, R.S., Oakes, S.G. (1987). The Effects of Ethanol on the Electrophysiology of Calcium Channels. In: Galanter, M. (eds) Recent Developments in Alcoholism. Recent Developments in Alcoholism, vol 5. Springer, Boston, MA. [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1684-6\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1684-6_13)
45. Maturu P, Vaddi DR, Pannuru P, Nallanchakravarthula V. Alterations in erythrocyte membrane fluidity and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> -ATPase activity in chronic alcoholics. *Mol Cell Biochem*. 2010;339(1-2):35–42. doi: 10.1007/s11010-009-0367-z.
46. Sonmez M, Ince HY, Yalcin O, Ajdžanović V, Spasojević I, Meiselman HJ, Baskurt OK. The effect of alcohols on red blood cell mechanical properties and membrane fluidity depends on their molecular size. *PLoS One*. 2013;8(9):e76579. doi: 10.1371/journal.pone.0076579.

47. Welbourn EM, Wilson MT, Yusof A, Metodiev MV, Cooper CE. The mechanism of formation, structure and physiological relevance of covalent hemoglobin attachment to the erythrocyte membrane. *Free Radic Biol Med*. 2017;103:95–106. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.024.
48. Gwoździński L, Krawczyk P, Dworniak D, Kowalczyk E, Błaszczyk J. Alterations in the erythrocyte plasma membranes in patients with alcohol-induced liver cirrhosis — preliminary results. *Arch Med Sci*. 2011;7(1):87–91. doi: 10.5114/aoms.2011.20609.
49. Venerando B, Fiorilli A., Croci G., et al. Acidic and neutral sialidase in the erythrocyte membrane of type 2 diabetic patients. *Blood*. 2002;99(3):1064–1070. doi: 10.1182/blood.V99.3.1064.
50. Contreras-Zentella M.L., Sánchez-Sevilla L., Suárez-Cuenca J.A., et al. The role of oxidant stress and gender in the erythrocyte arginine metabolism and ammonia management in patients with type 2 diabetes. *PLoS One*. 2019;14(7):p. e0219481. doi: 10.1371/journal.pone.0219481.
51. Maritim A.C., Sanders R.A., Watkins J.B. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 2003;17(1):24–38. doi: 10.1002/jbt.10058.
52. Pandey K.B., Rizvi S.I. Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2010;3(1):2–12. doi: 10.4161/oxim.3.1.10476.
53. Bissinger R., Bhuyan A.A. M., Qadri S. M., Lang F. Oxidative stress, eryptosis and anemia: a pivotal mechanistic nexus in systemic diseases. *The FEBS Journal*. 2018;286(5):826–854. doi: 10.1111/febs.14606.
54. Pretorius E., du Plooy J.N., Bester J. A Comprehensive Review on Eryptosis. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2016;39(5):1977–2000. doi: 10.1159/000447895.
55. Maellaro E., Leoncini S., Moretti D., et al. Erythrocyte caspase-3 activation and oxidative imbalance in erythrocytes and in plasma of type 2 diabetic patients. *Acta Diabetologica*. 2013;50(4):489–495. doi: 10.1007/s00592-011-0274-0.
56. Mehdi MM, Singh P, Rizvi SI. Erythrocyte sialic acid content during aging in humans: correlation with markers of oxidative stress. *Dis Markers*. 2012;32(3):179–86. doi: 10.3233/DMA-2011-0871.
57. Kumar, D., Rizvi, S.I. Erythrocyte membrane bound and plasma sialic acid during aging. *Biologia* 68, 762–765 (2013). <https://doi.org/10.2478/s11756-013-0207-1>
58. Petelska AD, Szeremeta M, Kotyńska J, Niemcunowicz-Janica A. Experimental and Theoretical Approaches to Describing Interactions in Natural Cell Membranes Occurring as a Result of Fatal Alcohol Poisoning. *Membranes (Basel)*. 2021;11(3):189. doi: 10.3390/membranes11030189.
59. Fernandes HP, Cesar CL, Barjas-Castro M de L. Electrical properties of the red blood cell membrane and immunohematological investigation. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2011;33(4):297–301. doi: 10.5581/1516-8484.20110080.
60. Arese P, Gallo V, Pantaleo A, Turrini F. Life and Death of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD) Deficient Erythrocytes — Role of Redox Stress and Band 3 Modifications. *Transfus Med Hemother*. 2012;39(5):328–34. doi: 10.1159/000343123.
61. Bulle S, Reddy VD, Padmavathi P, Maturu P, Puvvada PK, Nallanchakravarthula V. Association between alcohol-induced erythrocyte membrane alterations and hemolysis in chronic alcoholics. *J Clin Biochem Nutr*. 2017;60(1):63–69. doi: 10.3164/jcbn.16-16.
62. Шифман Ф.Дж. Патология крови. — Пер с англ. Жибурта Е.Б., Токарева Ю.Н. СПб.: «Издательство БИНОМ» — «Невский диалог»; 2000. — 448 с.
63. Limdi JK, Hyde GM. Evaluation of abnormal liver function tests. *Postgrad Med J*. 2003; 79(932): 307–12. doi: 10.1136/pmj.79.932.307.

---

© Кручинина Маргарита Витальевна (kruchmargo@yandex.ru); Белковец Анна Владимировна (belkovets@gmx.de);  
Паруликова Марина Владимировна (m\_parulikova@mail.ru); Громов Андрей Александрович (gromov.center@rambler.ru)  
Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»