

Вязкоупругие и электрические характеристики эритроцитов при различной степени фиброза печени

М. В. Кручинина¹, С. А. Курилович¹, М. В. Паруликова¹,
А. А. Громов¹, Т. С. Бакиров², В. М. Генералов², А. В. Пак²

¹ НИИ терапии СО РАМН;

² Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Новосибирск

В исследование включено 19 мужчин в возрасте от 35 до 60 лет с различными стадиями диффузных заболеваний печени. Степень выраженности фиброза установлена морфологически. Клинический диагноз устанавливался на основании комплекса клинических, инструментальных и морфологических методов исследования. Электрические и вязкоупругие характеристики эритроцитов измеряли методом диэлектрофореза в неоднородном переменном электрическом поле (НПЭП). Установлено, что жёсткость, вязкость, электрическая проводимость мембраны эритроцитов возрастают с увеличением степени фиброза печени. Эти показатели могут быть использованы как дополнительные характеристики фиброза печени с достаточно высокой прогностической ценностью.

Ключевые слова: диффузные заболевания печени, фиброз печени, эритроцит, диэлектрофорез.

© Коллектив авторов, 2005.

Статья поступила 23.11.2005 г.

Формирование и прогрессирование фиброза печени при её диффузных поражениях различного генеза являются одной из важнейших проблем гепатологии. Степень фиброза и скорость его прогрессирования определяют прогноз болезни и выбор терапии. Характеристика стадии болезни в гепатологическом диагнозе является обязательным компонентом после этиологии и активности.

«Золотым стандартом» оценки степени фиброза печени (стадии заболевания) является морфологический (гистологический) метод, инвазивный, требующий пункционной биопсии печени. По степени выраженности фиброз принято делить на 4 стадии [1]: первая характеризуется фиброзом нескольких портальных трактов, не выходящим за их пределы. Вторая стадия — фиброз большинства портальных трактов с редкими перипортальными септами и единичными порто-портальными тяжами. Эти две стадии характеризуют лёгкий и умеренный фиброз печени. При третьей стадии фиброза наблюдаются множество септ и фиброзных мостиков, но без нарушения дольковой структуры печени. Четвёртая стадия определяется при

формировании ложных (псевдо) долек и является цирротической.

В клинической практике наиболее широко используются системы полуколичественной оценки фиброза [2, 3]. Целью такой оценки является получение клинически значимого суммарного показателя, отражающего все морфологические признаки поражения печени. Однако в них отсутствуют строгие разграничения между критериями оценки фиброза и показателями выраженности некровоспалительного процесса (индекса гистологической активности).

Среди неинвазивных методов для установления степени фиброза печени используются ультразвуковой метод исследования (УЗИ), компьютерная томография (КТ), ядерно-магнитнорезонансная томография (Я-МРТ). Однако, их использование для разграничения фиброза на доцирротической стадии болезни весьма проблематично [4, 5].

В последние годы при диагностике фиброза печени всё чаще начинают использоваться биохимические методы, основанные на изучении активности ферментов, принимающих участие в образовании и деградации внеклеточного комплекса [1], но их использование затруднено в связи высокой трудоёмкостью и стоимостью методик.

Недостатками всех перечисленных методов является высокая трудоёмкость, необходимость применения широкой номенклатуры различных ингредиентов, субъективизм, иногда противодействие со стороны пациента и т. д. [1, 6]. Поэтому поиск новых подходов и методов неинвазивной диагностики фиброза печени весьма актуален.

Известно, что электрические свойства тел определяются величиной и динамикой движения их зарядов. Это в полной мере относится и к клетке. Нормально функционирующая клетка в состоянии покоя имеет разность потенциалов (напряжение) между цитоплазмой и

внешней средой. Для неё характерно высокое значение электрического потенциала, который формируется благодаря различию проницаемости мембраны для ионов калия и натрия. Разность потенциалов в процессе жизнедеятельности клетки постоянно изменяется и носит ярко выраженный колебательный характер. Эти колебания лежат в основе регуляции внутриклеточных процессов. Они связаны с делением, ростом, возбудимостью и другими физиологическими процессами, происходящими в клетке, и являются важнейшей характеристикой её жизнеспособности [7, 8].

Потенциал мембраны и его величина связаны с такими её параметрами как электрическая ёмкость, активное сопротивление и индуцированный дипольный момент клетки в целом. Последний отражает динамику движения электрических зарядов во всём клеточном объёме и, так или иначе, связан со всеми клеточными структурами. Для интактной, нормально функционирующей клетки в неоднородном переменном электрическом поле (НПЭП) характерна значительная величина дипольного момента [9—11].

В растворе электролита с низкой ионной силой, например, сахарозы, взаимодействие клетки с внешним НПЭП сопровождается смещением положительных и отрицательных её зарядов. Клетка поляризуется и формирует индуцированный дипольный момент. Поляризованная клетка под действием силы со стороны НПЭП приходит в движение. Это явление называется диэлектрофорезом. В НПЭП наблюдаются следующие эффекты: направленное поступательное движение и осаждение клеток на электродах; ориентация клеток вдоль силовых линий электрического поля; образование кооперативных цепочек из клеток; деформация клеток.

Экспериментально установлено, что степень поляризации клетки тесно связа-

на с её размерами, формой, а также биологической активностью. Так, например, коэффициент поляризации живых (биологически активных) клеток является весьма значительным, в то время как погибшие (с разрушенной мембраной) клетки практически не поляризуются [10—13]. Различают положительный (+ДЭФ) и отрицательный диэлектрофорез (–ДЭФ). Положительный диэлектрофорез наблюдается в высокочастотной области, отрицательный — в низкочастотной. Между ними располагается область равновесных частот. Положительный диэлектрофорез характеризуется поступательным движением клеток в сторону увеличения градиента напряжённости электрического поля, отрицательный — в сторону уменьшения. Область равновесных частот характеризуется вращением клеток вокруг собственной их оси и отсутствием поступательного движения [11, 14]. Под действием силы НПЭП амплитуда и динамика деформации клетки зависит от её вязкости и жёсткости [15].

Эритроцит — биологическая субстанция, которая обеспечивает транспорт кислорода и участвует в поддержании гомеостаза в органах и тканях организма. В силу многочисленности эритроцитов, основные физико-химические свойства крови определяются, преимущественно, этими клетками. Поскольку между расстройствами функций печени и гомеостазом крови существует тесная связь, то для клинической практики ценным диагностическим критерием состояния печени, в том числе степени накопления фиброза, может стать оценка электрических и вязкоупругих характеристик эритроцитов.

Целью работы: исследовать вязкоупругие и электрические характеристики эритроцитов методом диэлектрофореза у больных с диффузными заболеваниями печени и оценить возможность использования этих показателей

для дискриминирования степени выраженности фиброза.

Материал и методы

В исследование включено три группы пациентов (мужчины) в возрасте от 35 до 60 лет, подписавших информированное согласие на участие в исследованиях.

Степень выраженности фиброза печени устанавливалась на основании данных биопсии печени, которая проведена всем пациентам с диффузными заболеваниями печени. В группе условно здоровых мужчин биопсия печени не проводилась по этическим соображениям. Всем включённым в проект лицам выполнены биохимические и инструментальные исследования, УЗИ печени и селезенки, а также портальных сосудов. Вирусная этиология заболевания устанавливалась на основании обнаружения серологических маркёров методом иммуноферментного анализа (ИФА) и/или ДНК и РНК вирусов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), а алкогольная — при отрицательных результатах ИФА сывороточных маркёров вирусных гепатитов и достоверно подтверждённом систематическом потреблении алкоголя [16, 17].

По результатам совокупного анализа сформированы три группы: 1-я группа включала в себя 5 пациентов с первой или второй стадиями фиброза (лёгкий невыраженный фиброз F1—F2), во 2-ю группу входили 14 пациентов с третьей или четвёртой стадиями фиброза (выраженный фиброз F3—F4), 3-я группа состояла из 33 условно здоровых мужчин, у которых при клиническом и инструментальном обследовании патологии печени (F0) и сердца не выявлено.

Основной гипотезой исследования являлось предположение о разном поведении эритроцитов в НПЭП при различной выраженности фиброза печени и возможности его разграничения («лёгкий» — «тяжёлый» фиброз).

Исследования взаимодействия клеток с НПЭП, а также измерения физических характеристик эритроцитов проводили с помощью экспериментальной установки, которая включала в себя: компьютер с платой генератора напряжения ГСПФ 052, микроскоп с видеокамерой, монитор, масштабную линейку ОМПУ 4.2, а также измерительную ячейку. Генератор обеспечивал подачу на электроды измерительной ячейки переменного гармонического напряжения с амплитудой $U=10$ В на четырёх фиксированных частотах: 5×10^4 Гц, 10^5 Гц, 5×10^5 Гц и 10^6 Гц. Погрешность установки напряжения составляла меньше 5 %. Микроскоп с видеокамерой, монитор и компьютер предназначались для наблюдения за клетками.

Измерительная ячейка представляла собой плоскопараллельную стеклянную пластину, на которой методом напыления были нанесены хромовые электроды (рис. 1). Между электродами была расположена измерительная камера. Расстояние между электродами 60 мкм. К электродам измерительной ячейки припаивались проводники от генератора ГСПФ 052. Межэлектродное пространство накрывалось покровным стеклом.

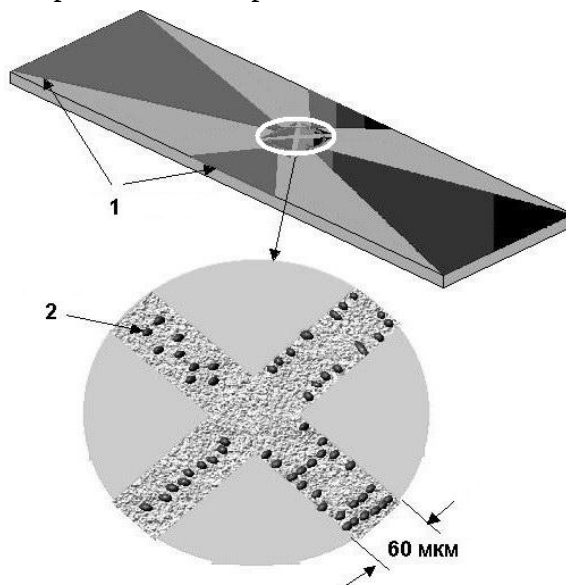


Рис. 1. Измерительная ячейка. 1 — хромовые электроды; 2 — клетки (эритроциты).

Оригинальная компьютерная программа позволила для каждого наблюдаемого через микроскоп эритроцита определить следующие электрические и вязкоупругие характеристики: поляризуемость, относительная поляризуемость, электропроводность мембран, средний радиус, вязкость, жёсткость, амплитуда деформации, индекс агрегации клеток эритроцитов, а также доля клеток с +ДЭФ и -ДЭФ.

Эритроциты получали из цельной крови пациентов. Для проведения исследования электрических и вязкоупругих показателей методом диэлектрофореза венозную кровь объёмом 2 мл забирали в пробирку типа вакутайнер с 3,7 % цитратным буфером в соотношении 9÷1, через 1 час кровь вносили в 0,3 М раствор сахарозы (рН 7,36) в соотношении 1÷20. Сразу после разведения эритроцитов производились измерения электрических и вязкоупругих характеристик эритроцитов при комнатной температуре в течение первых 6 секунд после включения напряжения. Морфология эритроцитов исследовалась в световом микроскопе в нативных препаратах.

Статистическая обработка данных проводилась с помощью программы SPSS 10, достоверность различий показателей оценивали по критериям Стьюдента, χ^2 , по Пирсону.

Результаты исследования и обсуждение

У лиц группы сравнения (F0) показатели морфометрии эритроцитов имели следующие соотношения: дискоциты 80—85 %, деформированные 5—10 %, сфероциты — 10 %.

В группе пациентов со степенью фиброза F1—F2 общеклинические, биохимические, морфометрические, инструментальные данные, УЗИ печени, селезенки, а также портальных сосудов позволили выявить наличие хронических вирусных гепатитов: у 3-х мужчин — типа С, у 2-х

— типа В с минимальной (у 2-х пациентов) и умеренной (у 3-х больных) биохимической активностью. Два пациента этой группы систематически употребляли алкоголь. Морфологическая активность процесса в этой группе соответствовала степени фиброза, т. е. была от 4 до 8 баллов. Морфометрия эритроцитов установила следующие пропорции: дискоциты 55—60 %, деформированные 10—15 %, сфероциты — 10 %, остальные формы эритроцитов (триангулоциты, эхиноциты, стоматоциты и др.) — 15 %.

В третьей группе пациентов у 7-и человек верифицирован хронический вирусный гепатит С; у 4-х мужчин — хронический вирусный гепатит В; сочетанная вирусная (В + С) инфекция диагностирована у 2-х больных; а сочетание В + D — у 1 пациента. При этом, у 8 из 14 мужчин хроническая вирусная инфекция протекала на фоне длительного злоупотребления алкоголем. Биохимическая активность гепатитов была умеренной. У большей части пациентов с циррозами печени (т. е. гепатитом IV стадии) (6 человек) степень компенсации по Чайлд—Пью соответствовала 8—10 баллам (класс В), у 2-х человек — 12—14 баллам (класс С). По данным биопсии большинство больных (12 человек) имели умеренную степень морфологической активности (от 9 до 12 баллов); у 2 она была выраженной (от 13 до 18 баллов). В крови наблюдалось 20—25 % деформированных эритроцитов, 25—30 % сфероцитов, 10—15 % асимметричных или двояковогнутых эритроцитов составляло 35—40 %, что было ниже нормы. Отмечено также набухание почти всех типов эритроцитов вследствие нарушения осмотического равновесия в крови.

В НПЭП практически все эритроциты у пациентов со степенью фиброза F3—F4 необратимо переходили в форму сфероцитов в течение 30 секунд. У паци-

ентов со степенью фиброза F1—F2 в форму сфероцитов трансформировались лишь отдельные клетки. Их эритроциты в течение указанного времени оставались в форме дискоцитов.

Наблюдения за характером поведения эритроцитов в НПЭП показали, эритроциты больных со степенью фиброза F1—F2 на частотах 0,5, 1×10^6 Гц обнаруживали ярко выраженную способность к деформации. Они вытягивались и приобретали высокую поступательную скорость в сторону ближайшего электрода. На частотах 0,05, $0,1 \times 10^6$ Гц деформации клеток не наблюдалось, однако незначительное количество эритроцитов под действием поля разрушалось.

У больных со степенью фиброза F3—F4 амплитуда деформации эритроцитов на частотах 0,5, 1×10^6 Гц полностью отсутствовала или была незначительная. Скорость поступательного движения клеток относительно электродов была существенно ниже, чем в группе со степенью фиброза F1—F2. На частоте $0,5 \times 10^6$ Гц наблюдалось значительное

ТАБЛИЦА 1. Электрические и вязкоупругие характеристики эритроцитов у больных с различной степенью фиброза печени (M±m)

Группы	Доля клеток, +ДЭФ 5×10 ⁵ Гц	Доля клеток, +ДЭФ 10 ⁶ Гц	Доля клеток, -ДЭФ 5×10 ⁵ Гц	Доля клеток, -ДЭФ 10 ⁶ Гц	Поляризуемость, М ³ 5×10 ⁴ Гц	Поляризуемость, М ³ 10 ⁵ Гц	Поляризуемость, М ³ 5×10 ⁵ Гц	Поляризуемость, М ³ 10 ⁶ Гц
1 группа	0,641± 0,048	0,697± 0,064	0,359± 0,039	0,303± 0,027	-1,989 ×10 ⁻¹⁵ ± 4,62 ×10 ⁻¹⁶	2,97 ×10 ⁻¹⁵ ± 2,63 ×10 ⁻¹⁶ ****	6,32 ×10 ⁻¹⁵ ± 1,92 ×10 ⁻¹⁵	3,339 ×10 ⁻¹⁵ ± 7,86 ×10 ⁻¹⁶ *
2 группа	0,905± 0,112 ***x	0,928± 0,085 **x	0,095± 0,103 ***xx	0,072± 0,064 **xxx	-6,98 ×10 ⁻¹⁵ ± 1,04 ×10 ⁻¹⁵ ***xxx	-3,243 ×10 ⁻¹⁵ ± 1,98 ×10 ⁻¹⁶ **** xxx	1,52 ×10 ⁻¹⁴ ± 3,98 ×10 ⁻¹⁵ x	10,08 ×10 ⁻¹⁵ ± 2,91 ×10 ⁻¹⁵ *x
3 группа	0,560± 0,060	0,720± 0,055	0,440± 0,062	0,280± 0,052	-1,91 ×10 ⁻¹⁵ ± 2,23 ×10 ⁻¹⁶	-1,0 ×10 ⁻¹⁵ ± 3,9 ×10 ⁻¹⁶	5,68 ×10 ⁻¹⁵ ± 8,8 ×10 ⁻¹⁶	1,6 ×10 ⁻¹⁵ ± 7,21 ×10 ⁻¹⁶

Продолжение таблицы 1

Группы	Электропроводность, см/м	Относит. поляризуемость	Средний радиус эритроц., м	Жесткость эритроц., Н/м	Индекс агрегации	Амплитуд а деформации, м	Вязкость, Па×с
1 группа	4,91 ×10 ⁻⁵ ± 1,04 ×10 ⁻⁵ **	-0,67 ±0,24	3,34 ×10 ⁻⁶ ± 6,31 ×10 ⁻⁸ ***	8,6 10 ⁻⁶ ± 1,24 ×10 ⁻⁶ ***	0,68 ±0,028 ***	1,39 ×10 ⁻⁶ ± 1,7 ×10 ⁻⁷ ****	0,59 ±0,121
2 группа	9,24 ×10 ⁻⁵ ± 1,17 ×10 ⁻⁵ xxx	-0,108 ±0,031 ***xx	4,24 ×10 ⁻⁶ ± 1,03 ×10 ⁻⁷ ***xxx	1,47 ×10 ⁻⁵ ± 1,98 ×10 ⁻⁶ ***xxx	0,76 ±0,019 ***xx	7,2 ×10 ⁻⁷ ± 1,4 ×10 ⁻⁷ ***xxx	0,91 ±0,087 ***x
3 группа	2,91 ×10 ⁻⁵ ± 3,0 ×10 ⁻⁶	-0,77 ±0,17	3,30 ×10 ⁻⁶ ± 1,31 ×10 ⁻⁷	4,2 ×10 ⁻⁶ ± 6,3 ×10 ⁻⁷	0,5 ±0,02	2,6 ×10 ⁻⁶ ± 1,1 ×10 ⁻⁷	0,32 ±0,05

Примечания. * — достоверность (p) отличия от 3-ей группы (F0); * — p < 0,05, ** — p < 0,02, *** — p < 0,01, **** — p < 0,001; x — достоверность (p) отличия от 1-й группы (F1—F2): x — p < 0,05, xx — p < 0,02, xxx — p < 0,01, xxxx — p < 0,001.

разрушение клеток. Отмечалась также повышенная способность эритроцитов к образованию агрегатов после перевода эритроцитов в 0,3 М раствор сахарозы.

Компьютерный анализ характера поведения эритроцитов в НПЭП выявил, что доля клеток с положительным диэлектрофорезом на частотах 0,5 и 1×10⁶ Гц была достоверно выше у больных со степенью фиброза F3—F4, чем у пациентов со степенью фиброза F1—F2 (0,905±0,112 против 0,641±0,048, p < 0,05 при частоте 0,5×10⁶ Гц;

0,928±0,085 против 0,697±0,064, p < 0,05 при частоте 1×10⁶ Гц) (табл. 1).

Поляризуемость клеток на низких частотах (0,05 и 0,1×10⁶ Гц) у больных со степенью фиброза F3—F4 была достоверно ниже, чем при степени фиброза F1—F2 (-6,98×10⁻¹⁵±1,04×10⁻¹⁵ против -1,987×10⁻¹⁵±4,62×10⁻¹⁶, p < 0,001 при частоте 0,05×10⁶ Гц и -3,243×10⁻¹⁵±1,98×10⁻¹⁶ против 2,97×10⁻¹⁵±2,63×10⁻¹⁶, p < 0,001 при частоте 0,1×10⁶ Гц). Поляризуемость клеток на частотах 0,05 и 0,1×10⁶ Гц обратно коррелировала

со стадией фиброза ($r=-0,359$, $p < 0,001$ и $r=-0,431$, $p < 0,05$ соответственно). На высоких частотах $0,5$ и 1×10^6 Гц поляризуемость эритроцитов во 2-й группе оказалась достоверно выше, чем в первой группе ($1,52 \times 10^{-14} \pm 3,98 \times 10^{-15}$ против $6,32 \times 10^{-15} \pm 1,92 \times 10^{-15}$, $p < 0,05$ при частоте $0,5 \times 10^6$ Гц и $10,08 \times 10^{-15} \pm 2,91 \times 10^{-15}$ против $3,34 \times 10^{-15} \pm 7,86 \times 10^{-16}$ при степени фиброза F1—F2, $p < 0,05$ при частоте 1×10^6 Гц). Поляризуемость эритроцитов на частоте 1×10^6 Гц прямо коррелировала со степенью фиброза ($r=0,363$, $p < 0,05$) и обратно — с классом цирроза печени ($r=-0,741$, $p < 0,033$). Поляризуемость на частоте $0,5 \times 10^6$ Гц также обнаруживала сильную обратную корреляцию со степенью компенсации цирроза ($r=-0,567$, $p < 0,051$). Относительная поляризуемость у больных 2-й группы также оказалась достоверно выше, чем в 1-й группе ($-0,108 \pm 0,031$ против $-0,67 \pm 0,24$, $p < 0,02$).

Электропроводность мембран эритроцитов нарастала по мере увеличения степени фиброза (от $4,91 \times 10^{-5} \pm 1,04 \times 10^{-5}$ в 1-й группе до $9,24 \times 10^{-5} \pm 1,17 \times 10^{-5}$ во 2-й группе, $p < 0,01$). Средний радиус эритроцитов также преобладал у больных 2-й группы ($4,24 \times 10^{-6} \pm 1,03 \times 10^{-7}$ против $3,34 \times 10^{-6} \pm 6,31 \times 10^{-8}$, $p < 0,001$).

По мере увеличения степени фиброза амплитуда деформации эритроцитов под действием НПЭП снижалась, демонстрируя минимальные значения во 2-й группе ($7,2 \times 10^{-7} \pm 1,4 \times 10^{-7}$ против $1,39 \times 10^{-6} \pm 1,7 \times 10^{-7}$, $p < 0,01$). При этом низкая

способность к деформации сочеталась с достоверно более высокими показателями жёсткости эритроцитов ($1,47 \times 10^{-5} \pm 1,98 \times 10^{-6}$ против $8,6 \times 10^{-6} \pm 1,24 \times 10^{-6}$, $p < 0,01$) и вязкости клеток ($0,91 \pm 0,087$ против $0,59 \pm 0,121$, $p < 0,05$). Получены обратные корреляции стадии фиброза с амплитудой деформации ($r=-0,646$, $p < 0,033$), прямые — с жёсткостью эритроцитов ($r=0,409$, $p < 0,05$). Вязкость клеток прямо коррелировала с классом цирроза печени ($r=0,632$, $p < 0,05$). Индекс агрегации эритроцитов при переводе в раствор сахарозы увеличивался по мере нарастания степени фиброза ($0,68 \pm 0,028$ в 1-й группе против $0,76 \pm 0,019$ во 2-й группе, $p < 0,02$).

В таблице 2 представлены результаты оценки возможностей метода диэлектрофореза эритроцитов для выявления степени фиброза печени по сравнению с данными биопсии, вычисленные по стандартным формулам [18].

В нормальных условиях в русле крови эритроциты находятся в диспергированном состоянии. Принято считать, что это состояние поддерживается за счёт электростатического отталкивания между эритроцитами [9, 14]. Они несут одинаковый интегральный по знаку поверхностный заряд. В этом плане эритроциты представляют собой гомогенную систему. Исследователи отмечают, что в ответ на воздействие разнообразных факторов

ТАБЛИЦА 2. Результаты оценки метода диэлектрофореза эритроцитов для выявления степени фиброза печени по сравнению с данными биопсии

Результаты диэлектрофореза эритроцитов	Результаты биопсии печени	
	Фиброз F3—F4 (n=14)	Фиброз F1—F2 (n=5)
Фиброз F3—F4 (n=12)	Истинно положительный фиброз F3—F4 (n=10)	Ложно положительный фиброз F1—F2 (n=2)
Фиброз F1—F2 (n=7)	Ложно отрицательный фиброз F3—F4 (n=4)	Истинно положительный фиброз F1—F2 (n=3)

Примечания. Чувствительность — $10 \div (10 + 4) \times 100\% = 71,43\%$; специфичность — $3 \div (2 + 3) \times 100\% = 60\%$; прогностическая ценность положительного результата метода — $10 \div (10 + 2) \times 100\% = 83,33\%$; прогностическая ценность отрицательного результата метода — $3 \div (4 + 3) \times 100\% = 42,86\%$; индекс точности — $(10 + 3) \div (10 + 2 + 4 + 3) \times 100\% = 68,42\%$.

эритроциты реагирует изменением величины мембранного потенциала. Вместе с тем, различные повреждающие факторы вызывают специфические первичные нарушения в эритроцитарной структуре, но эти изменения часто приводит к одному и тому же — агрегации эритроцитов [9].

Анализ полученных результатов позволил выявить высокие показатели проводимости мембраны, а также низкую поляризуемость эритроцитов во 2-й группе. Косвенно высокая проводимость мембраны и низкая поляризуемость указывают на низкий потенциал на мембране эритроцитов, поэтому они могут сближаться друг с другом и формировать агрегаты. Наблюдается высокий индекс агрегации. В свою очередь, агрегаты затрудняют кровоток через капилляры, формируются очаги локальной гипоксии. Так как уровень токсинов наиболее высок именно в поражённом органе (в нашем случае печени) происходит локальный «конфликт» эритроцитов. Он выражается в определённом нарушении структуры и функций, в том числе эритроцитов. Можно предположить, что в ходе прогрессирования фиброза печени продукты метаболизма (токсины) скачкообразно увеличивают проводимость мембраны эритроцитов и снижают их мембранный потенциал уже непосредственно в печени.

Известно, что одним из условий нормальной жизнедеятельности эритроцита является поддержание нормального потенциала на мембране за счёт внутриклеточного уровня АТФ [Atkinson, 1968], что требует от клетки относительно высоких энергетических затрат. Но высокая проводимость мембраны приводит к изменению ионного баланса в системе «среда—клетка», высокой величине ионного тока через мембрану и истощению запаса АТФ в эритроцитах. Эти факторы вызывают дальнейшую цепь взаимосвязанных событий: снижение соотношения площади поверхности

к объёму эритроцитов, превращение клеток в труднодеформируемые сферы, увеличение вязкости и жёсткости [7, 19, 20]. Наблюдается низкая амплитуда деформации эритроцитов или полное её отсутствие в НПЭП. Изменение пропорций долей клеток с \pm ДЭФ или $-$ ДЭФ указывает, что меняются частотная граница равновесной частоты и амплитудно-частотная зависимость поляризации клеток в целом.

Полученные нами экспериментальные данные и описанные возможные причинно-следственные связи развития фиброза печени согласуются с данными других авторов [1, 4, 5, 20, 21].

Различное поведение эритроцитов в НПЭП у пациентов с разными степенями фиброза позволяет предположить, что в эритроцитах действительно происходят изменения, как в цитоплазме, так и на мембране. Возможно, это связано с усилением процесса перекисного окисления липидов в мембранах, что рационально в условиях длительно существующей гипоксии, и, следовательно, накопления недоокисленных продуктов обмена. Аналогичные изменения происходят в мембранах гепатоцитов при прогрессировании фиброза печени [1, 5, 21]. Поэтому появление эритроцитов с подобными изменёнными свойствами мембраны и цитоплазмы можно рассматривать как прямой или опосредованный результат неблагоприятного внешнего воздействия, например, вирусных инфекций, токсинов. Наблюдаемые сдвиги в показателях обобщённой вязкости, жёсткости эритроцитов у пациентов 2-й группы могут быть также связаны со структурными перестройками как липидов, так и белковых компонентов мембран [7, 8, 22—24]. Хроническая интоксикация алкоголем, вирусная инфекция вызывают снижение текучести фосфолипидов, которое связывают с увеличением содержания холестерина и насыщенных жирных кислот [5, 20, 21].

Подобные сдвиги сказываются на электрических и вязкоупругих характеристиках эритроцитов [7—9].

Обобщённый анализ данных исследования вязкоупругих и электрических характеристик эритроцитов методом диэлектрофореза для диагностики различных стадий фиброза печени демонстрирует достаточно высокие показатели чувствительности (71,43 %) и специфичности (60 %) метода. Особенно обращает на себя внимание значение прогностической ценности положительного результата метода, т. е. выявление случаев со степенью фиброза F3—F4 — 83,33 %.

Таким образом, измерение амплитуды деформации, жёсткости, вязкости, электропроводности мембраны, индекса агрегации эритроцитов методом диэлектрофореза открывает новые возможности в неинвазивной диагностике крайних стадий фиброза печени.

Выводы

1. Доля клеток с положительным диэлектрофорезом на частотах 0,5 и 1×10^6 Гц достоверно выше у больных со степенью фиброза F3—F4 печени по сравнению с группой сравнения (F0) и больными со степенью фиброза F1—F2.

2. Поляризуемость клеток на низких частотах (0,05 и $0,1 \times 10^6$ Гц) у больных со степенью фиброза F3—F4 достоверно ниже, а на высоких частотах 0,5 и 1×10^6 Гц достоверно выше по сравнению с аналогичными показателями у лиц группы сравнения (F0) и у пациентов со степенью фиброза F1—F2.

3. По мере увеличения степени фиброза наблюдаются увеличение величин жёсткости, вязкости, среднего радиуса, индекса агрегации, а также электрической проводимости мембраны эритроцитов, при этом амплитуда деформации эритроцитов под действием НПЭП снижается.

4. Жёсткость, вязкость эритроцитов, а также амплитуда деформации, могут использоваться как дополнительные характеристики в целях диагностики степени фиброза печени с достаточно высокой предсказательной ценностью положительного результата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ивашкин Н. Т. Болезни печени и желчевыводящих путей. М., 2002.
2. Ishak K. G. Chronic hepatitis morphology and nomenclature // *Mod. Patbol.* 1994. Vol. 7. P. 690—713.
3. Knodell R. G., Ishak K. G., Black W. C. et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing biological activity in asymptomatic chronic active hepatitis // *Hepatology.* 1981. Vol. 1. P. 431—435.
4. Карпинский В. М., Фалькович М. Я. Диагностика заболеваний печени алкогольной этиологии // *Здравоохранение Казахстана.* 1980. № 1. С. 42—45.
5. Подымова С. Д. Болезни печени. М., 1993.
6. Панфилов С. А., Панфилова Е. В. Диагностика заболеваний печени, билиарного тракта с курсом патологической анатомии. М., 2003.
7. Геннис Г. Биомембраны: молекулярная структура и функция: Пер. с англ. М., 1997.
8. Мембраны и болезнь / Под ред. Болис Л., Хоффман Д. Ф., Лиф А.: Пер. с англ. М., 1980.
9. Владимирюв Ю. А., Потапенко А. Я. Физико-химические основы фотобиологических процессов. М., 1989.
10. Генералов В. М., Бакиров Т. С., Дурыманов А. Г. и др. Исследование вирус-клеточного взаимодействия методом диэлектрофореза // *Доклады академии наук.* 2002. Т. 383, № 2. С. 256—259.
11. Ситников А. Н., Бакиров Т. С., Генералов В. М. и др. Измерение вязкоупругих характеристик частиц методом диэлектрофореза // *Оптика атмосферы и океана.* 2003. Т. 16, № 05—06. С. 512—515.
12. Kanatip Ratanachoo, Peter R. C. Gascoyne, Mathuros Ruchirawat. Detection cellular response to toxicants by dielectrophoresis // *Biochemical et Biophysical Acta.* 2002. № 1564. P. 449—458.
13. Pohl H. A. Dielectrophoresis. London, 1978.
14. Бакиров Т. С., Генералов В. М., Пугачев В. Г. и др. Исследование амплитудно-частотной поляризации биочастиц в ответ на внешние воздействия // *Доклады академии наук.* 2001. Т. 377, № 3. С. 1—3.
15. Ying Huang, Xiao-Bo Wang, Gascoyne P. R. C. et al. Membrane dielectric responses of T-lymphocytes following mitogen stimulation // *Biochemical et Biophysical Acta.* 1999. № 1417. P. 51—62.
16. Медицинская лабораторная диагностика. СПб., 1997.
17. Энциклопедия клинических лабораторных тестов / Под ред. Тица Н. М., 1997.
18. Гринхальх Т. Основы доказательной медицины. М., 2004.
19. Атаухманов Ф. И. Регуляция метаболизма в эритроцитах: Автореф. дисс. ... д-ра биол. наук. М., 1982.

20. Сторожок С. А., Санников А. Г., Захаров Ю. М. Молекулярная структура мембран эритроцитов и их механические свойства. Тюмень, 1997.
21. Буверов А. О., Маевская М. В., Ивашкин В. Т. Алкогольная болезнь печени // Рус. мед. журнал. 2001. Т. 3, № 2. С. 39—42.
22. Заводник И. Б., Лапшина Е. А., Брышевская М. Эффект свободных жирных кислот на состояние липидного и белкового компонентов мембран // Биологические мембраны. 1995. Т. 12, № 5. С. 516—523.
23. Ando K., Beppu M, Kikugawa K. et all. Membrane proteins of human erythrocytes are modified by advanced glycation end products during aging in the circulation // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999. Vol. 258, № 1. P. 123—127.
24. Seppi C., Castellana M. A., Minetti G. et all. Evidence for membrane protein oxidation during in vivo aging of human erythrocytes // J. Clin. Pathol. 1989. Vol. 41, № 11. P. 1246—1250.

Kruchinina M. V., Kurilovich S. A., Parulikova M. V., Gromov A. A., Bakirov T. S., Generalov V. M., Pak A. V.

Viscoelastic and electric erythrocytes characteristics of patients with different levels of liver fibrosis

Under supervision there were 19 men in the age of from 35 till 60 years with different stages of liver diseases. Liver biopsy was carried out to evaluate the degree of liver fibrosis. To all men were carried out clinical, biochemical, instrumental and morphological inspections. In view of the morphological data patients were divided into two groups — the first group with the light and moderate liver fibrosis (F1—F2); the second — with the severe liver fibrosis and liver cirrhosis (F3—F4). There were the patients with chronic hepatitis B, C, D virus (HBV, HCV, HDV) infections, part of them were hard drinkers. There was a control group — 33 healthy men without liver (F0) and heart diseases. Measurement of electric and viscoelastic characteristics of erythrocytes carried out a method of dielectrophoresis. It is experimentally established: rigidity, viscosity, electric conductivity of a membrane of erythrocytes are increased with growing the degree of liver fibrosis. These electric and viscoelastic parameters of erythrocytes can be used as additional characteristics of liver fibrosis with a enough high prognostic value.

Keywords: diffusion liver diseases, liver fibrosis, erythrocyte, dielectrophoresis.