

**ВОЗМОЖНОСТИ МЕТОДА ДИЭЛЕКТРОФОРЕЗА ЭРИТРОЦИТОВ
В ДИФФЕРЕНЦИРОВАНИИ ЖИРОВОЙ БОЛЕЗНИ ПЕЧЕНИ
АЛКОГОЛЬНОГО И НЕАЛКОГОЛЬНОГО ГЕНЕЗА У МУЖЧИН**

**М.В. Кручинина¹, М.В. Паруликова¹, С.А. Курилович¹, А.А. Громов¹,
В.М. Генералов², В.Н. Кручинин³, С.В. Рыхлицкий³, А.А. Шестов⁴**

¹*НИИ терапии и профилактической медицины –
филиал ФГБНУ ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН
630089, г. Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, 175/1*

²*ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора
630559, Новосибирская область, Кольцово*

³*ФГБНУ Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова СО РАН
630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 13*

⁴*Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, USA*

Цель работы – изучить возможности использования вязкоупругих параметров эритроцитов и их ассоциаций с уровнем липидов крови для дифференцирования жировой болезни печени алкогольного и неалкогольного генеза у мужчин. Обследованы 54 мужчины (44,62±1,52 года) с жировой болезнью печени по данным УЗИ органов брюшной полости, степень выраженности фиброза печени соответствовала 0-1 (*FibroScan® 502 Echosens, Франция*). Всем пациентам проведено исследование вязкоупругих параметров эритроцитов методом диэлектрофореза: определены величины амплитуды деформации и обобщенных показателей вязкости и жесткости (базовые и после экспозиции с 10 мкл 0,02%-го раствора этанола *in vitro* в течение 300 с). Динамика вязкоупругих параметров эритроцитов под действием этанола позволила выделить две группы пациентов с диаметрально противоположными трендами. Лица со снижением амплитуды деформации эритроцитов на фоне нарастания обобщенных вязкости и жесткости ($n = 26$) состояла преимущественно из пациентов с метаболическим синдромом, не пьющих или эпизодически употребляющих алкоголь в низких дозах (менее 20 г в пересчете на чистый этанол). Группа с увеличением деформируемости эритроцитов при снижении обобщенных вязкости и жесткости ($n = 28$) включала в себя систематических потребителей алкоголя, находившихся в состоянии абстиненции. Экспозиция с этанолом, важным энергетическим субстратом в данной группе, встроенным в метаболические процессы, приводила к нарастанию

Кручинина Маргарита Витальевна – д-р мед. наук, в.н.с. лаборатории гастроэнтерологии, e-mail: kruchmargo@yandex.ru

Паруликова Марина Владимировна – врач-гастроэнтеролог, зав. гастроэнтерологическим центром ЧУЗ «Клиническая больница «РЖД-Медицина» г. Новосибирск»; старший преподаватель отдела образования, НИИТП – ФИЦ ИЦиГ СО РАН, e-mail: m_parulikova@mail.ru

Курилович Светлана Арсентьевна – д-р мед. наук, проф., зав. лабораторией гастроэнтерологии, e-mail: kurilovich@yandex.ru

Громов Андрей Александрович – канд. мед. наук, с.н.с., руководитель группы исследования гемостаза лаборатории клинических биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний, e-mail: gromovcenter@rambler.ru

Генералов Владимир Михайлович – д-р техн. наук, в.н.с. отдела биофизики и экологических исследований, e-mail: general@vector.nsc.ru

Кручинин Владимир Николаевич – канд. хим. наук, н.с. лаборатории эллипсометрии, e-mail: vladd.kruch@yandex.ru

Рыхлицкий Сергей Владимирович – канд. техн. наук, зав. лабораторией эллипсометрии, e-mail: rhl@isp.nsc.ru

Шестов Александр Александрович – PhD, Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, USA, e-mail: ashestov@gmail.com

© Кручинина М.В., Паруликова М.В., Курилович С.А., Громов А.А., Генералов В.М., Кручинин В.Н., Рыхлицкий С.В., Шестов А.А., 2020

амплитуды деформации клеток. Установлены корреляции вязкоупругих параметров эритроцитов со стилем потребления алкоголя, компонентами метаболического синдрома, показателями липидного профиля, печеночными пробами. Выявлены прямая ассоциация амплитуды деформации эритроцитов с уровнем холестерина липопротеинов высокой плотности и обратные — с содержанием общего холестерина, холестерина липопротеинов низкой плотности, триглицеридов; обобщенные показатели вязкости и жесткости коррелировали с концентрацией указанных липидов инверсно по сравнению с амплитудой деформации. Диагностическая точность различения жировой болезни печени алкогольного и неалкогольного генеза при использовании модели, включающей вязкоупругие параметры эритроцитов и их изменения после экспозиции с этанолом *in vitro*, с помощью методов Random Forest и SVM составила 99 % с чувствительностью 98 % и специфичностью 99 %.

Ключевые слова: жировая болезнь печени, этиология, дифференциальная диагностика, эритроциты, диэлектрофорез, этанол, острое воздействие.

Жировая болезнь печени (ЖБП) (жировой гепатоз, стеатоз, жировая инфильтрация, жировая дистрофия печени) — хроническое заболевание, при котором происходит накопление жировых компонентов в нормальных клетках печени, перерождение гепатоцитов в жировую ткань, т.е. ожирение печени. Эта патология весьма распространена с тенденцией к росту как в России (37, 3% согласно данным DIREG 2, 2015) [1, 2], так и в странах Европы, США (20–33 %) [3]. ЖБП включает в себя алкогольную болезнь печени (АБП), которая связана с употреблением этанола в гепатотоксичных дозах, и неалкогольную (НАЖБП) (первичную), ассоциированную с метаболическим синдромом, — после исключения других неалкогольных этиологических факторов [4].

В связи с общностью морфологических изменений, звеньев патогенеза, метаболических нарушений, предрасполагающих факторов было предложено выделить новую нозологическую форму — метаболически ассоциированную ЖБП (metabolic associated fatty liver disease, MAFLD) [5]. Вместе с тем в ряде исследований убедительно показано, что НАЖБП и АБП имеют различия по рискам развития ряда патологий. Так, НАЖБП признана независимым фактором риска сердечно-сосудистой смерти, который возрастает в 3,2 раза при выявлении стеатоза по данным УЗИ [6].

Установлено, что самая ранняя стадия НАЖБП — стеатоз, знаменует собой глубокое метаболическое нарушение, которое может отражаться не только на сердечно-сосудистых рисках, но даже на объеме мозга (данные МРТ, Фрамингемское исследование) [7]. Показано, что НАЖБП — независимый фактор прогрессирования риска сердечно-сосудистых заболеваний из-за значительного совпадения прогрессирующей НАЖБП и высокого риска сердечно-сосудистой патологии, и активное лечение стеатоза позволит улучшить жизненный прогноз у этих пациентов [8]. С другой стороны, обнаружено, что

АБП имеет более высокий потенциал прогрессирования в аденокарциному, чем НАЖБП [9]. Ряд авторов продемонстрировали большие темпы прогрессирования фиброза печени в случаях алкогольного генеза заболевания [10], что может быть установлено неинвазивными методами, включая непрямую эластометрию. Однако для выявления различий в скорости развития фиброза печени у пациентов с ЖБП алкогольной и неалкогольной этиологии необходимо наблюдение в динамике, начальный же уровень фиброза может быть сходным.

Известны и широко используются визуализирующие, биохимические методы определения стеатоза печени. УЗИ является признанным скрининговым методом диагностики жирового гепатоза в соответствии с Клиническими рекомендациями EASL-EASD-EASO по диагностике и лечению НАЖБП, Российского общества по изучению печени и Российской гастроэнтерологической ассоциации [11, 12]. Более того, в 2016 г. Y.Y. Liao et al. показали возможность количественной оценки степени стеатоза по объективным показателям УЗИ с диагностической точностью метода AUROC 0,73–0,84 [13].

Биопсия печени, будучи «золотым стандартом» для определения степени фиброза и цирроза, оказывается малоприменимой для дифференциальной диагностики ЖБП вследствие инвазивности, ошибок, связанных как с «человеческим фактором», так и с информативностью биоптата (фрагментарность). Немаловажны и трудоемкость процедуры, необходимость госпитализации, высокий риск осложнений, высокая стоимость. Кроме того, морфологическая картина при АБП и НАЖБП бывает сходной, например, тельца Мэллори, считавшиеся ранее специфичными для алкогольного гепатита, обнаруживают и при неалкогольном стеатогепатите [14].

Количественный анализ степени стеатоза (CAP-функция) с помощью транзитной эластографии дает возможность обойтись без биопсии печени [4], но данный метод не позволяет

выявить этиологию заболевания. Протонная магнитно-резонансная спектроскопия является эффективной неинвазивной методикой диагностики для динамической и количественной оценки содержания жира в печени при неалкогольной жировой инфильтрации. Ее позиционируют как единственный неинвазивный метод, позволяющий количественно, с высокой чувствительностью и специфичностью (сравнимыми с таковыми при морфологическом исследовании) определить степень жировой инфильтрации печени [15]. Однако дифференцировать АБП и НАЖБП данный метод не помогает.

Биохимические тесты для диагностики АБП и НАЖБП (фибротесты) базируются на показателях крови, ассоциированных с наличием сопутствующих биохимических нарушений, в частности, липидного и углеводного обмена. Наиболее широко применяются тесты, позволяющие выполнить количественную оценку фиброза (ФиброТест) и некровоспалительной активности (АктиТест), выявить наличие стеатогепатита (СтеатоТест), его неалкогольную (НешТест) и алкогольную (АшТест) формы [16–18]. Оказалось, что использование указанных фибротестов также не дает возможность установить этиологию заболевания печени.

Увеличение среднего корпускулярного объема эритроцитов (СКОЭ) признано в качестве дифференциально-диагностического признака НАЖБП и АБП [12]. Преимущества этого показателя состоят в простоте измерения, довольно высокой чувствительности (до 96 %), медленной нормализации при воздержании от алкоголя [19]. Показано, что СКОЭ увеличен у 50–60 % лиц, злоупотребляющих алкоголем [20], а по некоторым данным — у 95 % [21]. Вместе с тем выявлено повышение СКОЭ при ряде заболеваний и состояний, не связанных с употреблением алкоголя: пищевые дефициты (фолаты, витамин В12), миелодисплазия, ретикулоцитозы (наследственный сфероцитоз, эллипсоцитоз, энзимопатии, гемолитические анемии), синдром мальабсорбции (целиакия, лимфома, амилоидоз кишечника, болезнь Уиппла), прием некоторых препаратов (антиметаболические — цитостатики, противоопухолевые; антибиотики, иммунодепрессанты, пероральные противозачаточные средства, тяжелые металлы, антиретровирусные, препараты, вызывающие гемолиз, лекарственные травы), факторы, вызывающие травматизацию эритроцитов (механические протезы клапанов сердца, регургитации), гипотиреоз, неалкогольные поражения печени, курение [20, 22]. Недостаточная специфичность данного показателя ограничивает возможности его применения как дифференциально-диагностического.

Таким образом, известные и применяемые в клинической практике методы позволяют выявить наличие стеатоза, оценить его количественно с разной степенью чувствительности и специфичности, однако не дают возможности выявить генез заболевания. Поэтому проблема дифференциальной диагностики НАЖБП и АБП продолжает оставаться актуальной, особенно на ранних стадиях, когда процесс обратим [14, 18].

В проведенных нами ранее исследованиях продемонстрированы различия электрических и вязкоупругих характеристик эритроцитов у пациентов с ЖБП различного генеза при исследовании клеток методом диэлектрофореза, проанализированы возможные механизмы различной реакции эритроцитов после экспозиции с раствором этанола [23, 24]. Предложенный метод различения алкогольного и неалкогольного генеза ЖБП при проведении эксперимента с раствором этанола *in vitro* лег в основу созданного патента на изобретение [25].

Цель работы — изучить возможности использования вязкоупругих параметров эритроцитов и их ассоциаций с уровнем липидов крови для дифференцирования жировой болезни печени алкогольного и неалкогольного генеза у мужчин.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Дизайн исследования — сравнительное нерандомизированное открытое исследование серии случаев. Обследованы 54 мужчины (средний возраст $44,62 \pm 1,52$ года) с ЖБП 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 [26]. У всех обследованных она не превышала I степени. Вирусная этиология заболевания исключена на основании отсутствия серологических маркеров (иммуноферментный анализ) и ДНК или РНК вирусов (полимеразная цепная реакция). В настоящей работе использованы термины «АБП» (коды МКБ-10 K70.0 Алкогольная жировая дистрофия печени [стеатоз] и K70.1 Алкогольный гепатит) и «НАЖБП» (код K 76.0 Жировая дегенерация печени, не классифицированная в других рубриках) [12].

Всем пациентам выполнено исследование вязкоупругих параметров эритроцитов (амплитуда деформации, обобщенные показатели вязкости и жесткости) с помощью электрооптической системы детекции клеток методом диэлектрофореза [27]. Исследование проведено дважды: определен базовый уровень показателей, а также их

значения после экспозиции эритроцитов с 10 мкл 0,02%-го раствора этанола в течение 300 с [24].

Статистическую обработку результатов исследования проводили, вычисляя среднее арифметическое значение (M), ошибку среднего арифметического значения (m), и представляли в виде $M \pm m$. Различия между двумя независимыми группами оценивали с помощью тестов Стьюдента, Уэлча, Манна – Уитни и χ^2 . Для дифференцирования показателей между группами применяли метод главных компонент (РСА-анализ), дискриминантный анализ наименьших квадратов (PLSDA-анализ), последний обеспечил ранжирование параметров эритроцитов по их вкладу в различие НАЖБП и АБП. Наличие взаимосвязи между дискретными переменными определяли с использованием коэффициентов корреляции Спирмена (r), визуализация ассоциаций представлена с помощью тепловой карты (heatmap). Диагностическую точность панелей показателей оценивали с помощью алгоритма Random Forest и SVM-анализа. Предсказательная точность созданной модели подтверждена кросс-валидацией (PCP-average). Во всех процедурах статистического анализа критический уровень значимости нулевой гипотезы (p) принимался равным 0,05.

Исследование одобрено Этическим комитетом ФГБНУ НИИТМ (протокол заседания № 122 от 29.11.2016). Все обследуемые дали информированное согласие на участие в работе в соответствии с Хельсинкской декларацией Все-

мирной 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.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Эритроциты продемонстрировали две тенденции изменения амплитуды деформации под действием неоднородного переменного электрического поля в ответ на экспозицию с раствором этанола. Соответственно пациенты были разделены на две группы: с уменьшением ($n = 26$) и увеличением ($n = 28$) параметра. Поскольку с амплитудой деформации тесно связаны обобщенные показатели вязкости и жесткости, они также были проанализированы в динамике эксперимента с этанолом (табл. 1).

Как видно из представленных в табл. 1 данных, снижение амплитуды деформации в 1-й группе после экспозиции с этанолом ассоциировано с достоверным нарастанием обобщенных показателей вязкости и жесткости, во 2-й группе увеличение способности клеток к деформации коррелировало с уменьшением показателей вязкости и жесткости. Группы значительно различались по величине базовой амплитуды деформации, однако у части пациентов индивидуальные величины этого параметра были сопоставимы, поэтому отнесение в различные группы оказалось возможным только после проведения

Таблица 1

Вязкоупругие параметры эритроцитов у пациентов с ЖБП

Показатель	1-я группа, $n = 26$	2-я группа, $n = 26$
Амплитуда деформации, $\times 10^{-6}$ м:		
базовая	$6,99 \pm 0,08$	$5,18 \pm 0,14^{\wedge}$
после экспозиции с этанолом	$5,38 \pm 0,16^{**}$	$6,66 \pm 0,12^{*,\wedge}$
дельта	$1,73 \pm 0,09$	$1,47 \pm 0,09^{\#}$
Обобщенный показатель жесткости, $\times 10^{-6}$ Н/м		
базовый	$8,27 \pm 0,15$	$10,11 \pm 0,11^{\wedge}$
после экспозиции с этанолом	$9,84 \pm 0,12^{**}$	$8,35 \pm 0,14^{*,\wedge}$
дельта	$1,56 \pm 0,10$	$1,15 \pm 0,08$
Обобщенный показатель вязкости, $\times 10^{-1}$ Па · с:		
базовый	$7,0 \pm 0,09$	$8,23 \pm 0,11^{\wedge}$
после экспозиции с этанолом	$8,21 \pm 0,10^{*}$	$6,92 \pm 0,15^{*,\wedge}$
дельта	$1,76 \pm 0,13$	$1,31 \pm 0,1$

Примечание. Дельта параметра соответствует модулю разницы между его базовой величиной и значением после экспозиции с этанолом; обозначены статистически значимые отличия от величин соответствующих базовых показателей группы контроля (* – при $p < 0,05$, ** – при $p < 0,01$) и 1-й группы ($\wedge$ – при $p < 0,0001$, $\#$ – тенденция ($p = 0,099$)).

эксперимента с этанолом и анализа динамики показателя. Степень изменения вязкоупругих параметров эритроцитов оказалась сопоставимой в обеих группах с некоторой тенденцией к большей степени изменения амплитуды деформации в 1-й группе (см. табл. 1).

Визуализацию различий в уровнях вязкоупругих параметров эритроцитов обеспечила тепловая карта (рис. 1, а, б), которая демонстрирует

инверсное изменение характеристик эритроцитов после их экспозиции с раствором этанола. Следует отметить обратный характер связей между амплитудой деформации эритроцитов и обобщенными показателями вязкости и жесткости (рис. 1, в).

На следующем этапе исследования мы проанализировали сведения о пациентах, оказавшихся в разных группах согласно амплитуде де-

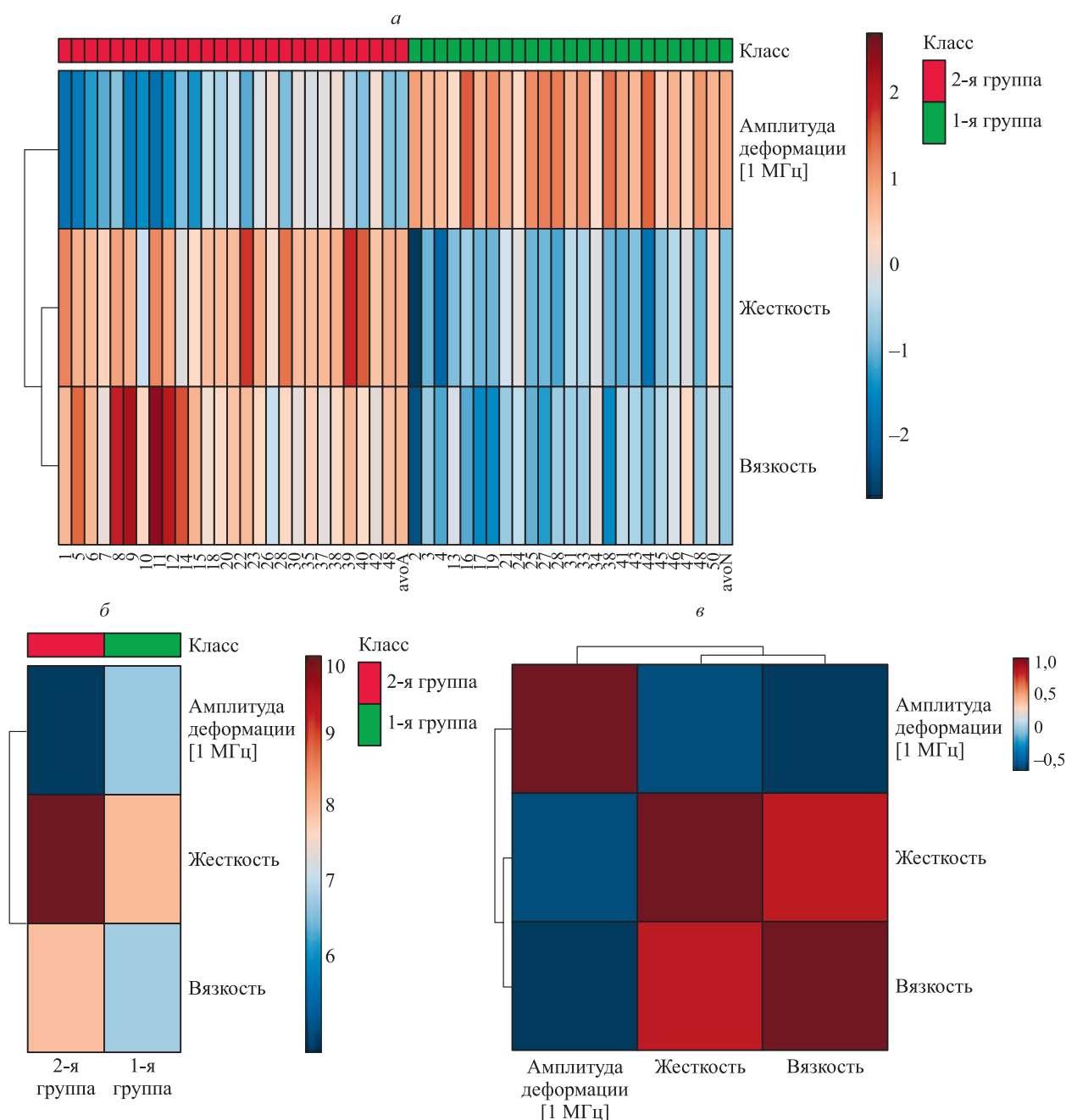


Рис. 1. Тепловая карта, обеспечивающая визуализацию различных трендов изменения параметров эритроцитов после их экспозиции с раствором этанола (а, б) и корреляций вязкоупругих параметров эритроцитов между собой (в)

Таблица 2

Клинико-биохимические показатели у пациентов с жировой болезнью печени

Показатель	1-я группа, n = 26	2-я группа, n = 26	p
Возраст, лет	42,25±2,23	46,81±2,0	0,109
Индекс массы тела, кг/м ²	32,89±0,85	26,16±0,41	0,0001
Окружность талии, см	114,62±2,57	97,84±0,83	0,0001
Содержание/активность в сыворотке крови:			
инсулина, мкМЕ/мл	35,94±1,76	19,81±1,18	0,001
общего холестерина, мг/дл	251±7,3	218,6± 6,29	0,005
холестерина ЛПВП, мг/дл	37,15±1,56	46,87± 1,72	0,0001
холестерина ЛПНП, мг/дл	187,47±7,32	142,9± 6,46	0,0001
триглицеридов, мг/дл	216,55±12,43	170,22± 10,39	0,004
глюкозы натощак, ммоль/л	6,49± 0,14	5,5± 0,08	0,0001
общего белка, г/л	73,5± 0,58	70,3± 0,52	0,0001
альбумина, г/л	47,02 ± 0,47	44,32± 0,47	0,0001
общего билирубина, мкмоль/л	14,22± 0,65	19,5 ± 0,78	0,0001
прямого билирубина, мкмоль/л	3,65± 0,21	5,47± 0,15	0,001
мочевой кислоты, мг/дл	423,5± 7,41	359,4± 8,15	0,006
креатинина, мкмоль/л	79,14± 1,36	85,8± 2,04	0,013
мочевины, ммоль/л	5,15± 0,12	5,57±0,14	0,014
железа, мкмоль/л	15,23± 0,49	20,88 ± 0,69	0,0001
АлАТ, Ед/л	39,67± 4,26	43,2 ± 2,26	0,028
АсАТ, Ед/л	28,33± 1,59	50,07 ± 2,52	0,0001
гамма-глутамилтранспептидазы, Ед/л	28± 2,06	58,99± 2,22	0,0001
щелочной фосфатазы, Ед/л	138,84 ± 6,6	178,3± 4,88	0,0001
Коэффициент Де Ритиса	0,78± 0,03	1,17± 0,016	0,0001
Эластичность печени, кПа	4,97± 0,18	5,92 ± 0,17	0,001
ИндексNAFLD liver fat score	4,04± 0,29	1,23± 0,21	0,0001
Индекс Caro	0,19± 0,01	0,30± 0,014	0,0001

Примечание: ЛПВП – липопротеины высокой плотности; ЛПНП – липопротеины низкой плотности; АлАТ – аланинаминотрансфераза; АсАТ – аспартатаминотрансфераза; индекс NAFLD liver fat score подсчитывали по формуле [31]: NAFLD-LFS = $-2,89 + 1,18 \times (\text{метаболический синдром: да} - 1, \text{нет} - 0) + 0,45 \times (\text{сахарный диабет 2 типа: да} - 2, \text{нет} - 0) + 0,15 \times (\text{содержание инсулина, мкМЕ/мл}) + 0,04 \times (\text{активность АсАТ, Ед/л}) - 0,94 \times \text{АсАТ/АлАТ}$.

формации эритроцитов. Особое внимание уделено стилю потребления алкоголя, наличию метаболического синдрома, биохимическим параметрам, отражающим липидный спектр, состояние функции печени, пуринового обмена. Мужчины обеих групп были сопоставимы по возрасту (табл. 2). Большая часть пациентов первой группы эпизодически (1–4 раза в год) потребляла низкие дозы алкоголя (в среднем 14,95±2,0 г в сутки в пересчете на чистый этанол) или не потребляла спиртные напитки вообще, два человека потребляли алкоголь 1–2 раза в неделю в невысоких дозах (до 40 г в сутки) в течение 5–7 лет. Вторая группа (85,7 %) состояла преимущественно из регулярных потребителей алкоголя (более 3 раз в неделю, разовая

доза – 120,73±14,3 г, недельная – 641,87±84,9 г). В момент исследования крови пациенты находились в состоянии абстиненции (в среднем на 4,96±0,61 дня), причем доза алкоголя, выпитого накануне, составила 125,32±15,9 г. Большая часть мужчин (82,1 %) второй группы имела алкогольный стаж от 8 до 22 лет. Таким образом, первая группа преимущественно состояла из непьющих или редких потребителей низких доз алкоголя (92,3 %), во второй группе оказались регулярные потребители высоких гепатотоксичных доз алкоголя с длительным стажем.

У всех пациентов первой группы обнаружены признаки метаболического синдрома – абдоминальное ожирение, артериальная гипертензия, гипертриглицеридемия, гиперхолестерин-

немия, установлено повышение в крови уровня инсулина, глюкозы, мочевой кислоты. Индекс Саго, подсчитанный как соотношение содержания глюкозы и инсулина [12], у пациентов первой группы был достоверно ниже, чем у лиц второй группы (см. табл. 2). Величина данного показателя менее 0,33 свидетельствовала о наличии инсулинрезистентности у всех пациентов первой группы и у восьми мужчин второй группы.

У мужчин второй группы отмечены избыточная масса тела и увеличение окружности талии, более чем у 50 % обследованных была артериальная гипертензия, содержание холестерина ЛПНП у большей части пациентов (61,5 %) превышало 3,0 ммоль/л, триглицеридов – 1,7 ммоль/л, что, вероятно, отражает общие звенья патогенеза при развитии ЖБП алкогольного и неалкогольного генеза [28]. Концентрация холестерина ЛПВП у лиц второй группы была выше 1,0 ммоль/л, что служит маркером систематического потребления алкоголя [29, 30].

Уровень большей части биохимических показателей находился в пределах референсных значений (см. табл. 2). Вместе с тем у пациентов второй группы оказались несколько повышенными активность АсАТ, гамма-глутамил-транспептидазы, соотношение АсАТ/АлАТ, уровень прямого билирубина, что, видимо, отражает наличие хронической алкоголизации, токсическое воздействие на гепатоциты у пациентов с жировым гепатозом алкогольного генеза [14].

Содержание общего белка и альбумина у лиц второй группы оказалось достоверно меньше, чем у обследованных первой группы, свидетельствуя о влиянии алкогольной интоксикации на синтетическую функцию печени (см. табл. 2). Более высокая активность щелочной фосфатазы, по-видимому, является отражением токсического воздействия этанола на мембраны клеток с элементами синдрома холестаза. Увеличение содержания железа в сыворотке крови пациентов второй группы, очевидно, связано с повышенной проницаемостью мембран гепатоцитов на фоне хронической алкоголизации [14, 18]. Ассоциированное с хроническим потреблением алкоголя изменение функции выделительной системы проявилось в достоверно более высоком уровне креатинина и мочевины (см. табл. 2). Эластичность печени у лиц второй группы оказалась значимо больше, что косвенно свидетельствует о более высоком фиброгенном потенциале АБП [10]; напротив, индекс NAFLD liver fat score был меньше (см. табл. 2).

Корреляции вязкоупругих параметров эритроцитов с клиническо-биохимическими показателями проанализированы суммарно у пациентов обеих групп (табл. 3). Анализ корреляций

продемонстрировал наличие обратных ассоциаций между амплитудой деформации эритроцитов и интенсивностью потребления алкоголя, при этом большая сила связей выявлена для обычной разовой дозы и частоты потребления алкоголя. Те же аспекты потребления алкоголя имели более тесные прямые связи с обобщенной вязкостью эритроцитов. Для обобщенного показателя жесткости также оказались значимыми последняя принятая доза алкоголя и недельная доза. Установленные корреляции между вязкоупругими параметрами эритроцитов и характером потребления алкоголя не случайны.

Данные ряда исследований свидетельствуют о значительных изменениях структурно-функциональных параметров клеток красной крови на фоне хронической алкоголизации. Они касаются как структуры мембран эритроцитов (изменение соотношения холестерина к общей фракции фосфолипидов в пользу первого, снижение уровня легкоокисляемых фосфолипидов, появление аномального фосфолипида – фосфатидилэтанола, увеличение содержания насыщенных жирных кислот, в том числе их этиловых эфиров, экстернализация фосфолипидов внутреннего слоя мембран эритроцитов (фосфатидилсерина, фосфатидилэтаноламина) [32–35], уменьшение содержания фосфатидилхолина, образование аддуктов этанола и ацетальдегида с белками мембран эритроцитов [36]), так и внутреннего содержимого клеток (нарастание деструктуризации гемоглобина, появление «сшивок» его компонентов с внутренним слоем мембран, увеличение участков неокислительного взаимодействия этанола и ацетальдегида с гемоглобином с накоплением аддуктов [37, 38]). Вышеописанные сдвиги приводят к снижению способности клеток красной крови к деформации [23, 27, 32]. Хронический прием алкоголя ассоциирован с изменениями в липидном профиле, сопровождается повышением уровня глюкозы, мочевой кислоты, развитием инсулинрезистентности [39], поэтому у пациентов с АЖБП воздействие этанола на эритроциты усугубляется имеющимися метаболическими сдвигами, т.е. эффект оказывается более выраженным [40].

Установлены обратные корреляции амплитуды деформации с проявлениями метаболического синдрома, причем наиболее тесные – с уровнем глюкозы, инсулина и холестерина ЛПНП. Выявленные ассоциации, вероятно, обусловлены изменениями параметров эритроцитов у пациентов с метаболическим синдромом. Так, показано, что С-пептид проинсулина у таких больных снижает деформируемость клеток, изменяет их форму через воздействие на Na,K-АТФазу мембран эритроцитов [41], конформационные

Таблица 3

Корреляции вязкоупругих параметров эритроцитов с клинико-биохимическими показателями, r (p)

Показатель	АД, $\times 10^{-6}$ м	Дельта АД	ОПЖ	Дельта ОПЖ	ОПВ	Дельта ОПВ
Возраст, лет	-0,284 (0,046)	н/з	н/з	н/з	0,253 (0,076)	н/з
Последняя доза алкоголя, г	-0,39 (0,027)	н/з	0,504 (0,03)	н/з	0,298 (0,097)	н/з
Недельная доза алкоголя, г	-0,359 (0,044)	н/з	0,571 (0,001)	н/з	н/з	н/з
Обычная разовая доза алкоголя, г	-0,576 (0,0001)	н/з	0,669 (0,0001)	н/з	0,467 (0,001)	н/з
Частота потребления алкоголя	-0,59 (0,0001)	н/з	0,794 (0,0001)	н/з	0,521 (0,002)	н/з
Индекс массы тела, $\text{кг}/\text{м}^2$	-0,507 (0,0001)	-0,342 (0,015)	0,677 (0,0001)	н/з	0,494 (0,0001)	н/з
Окружность талии, см	-0,495 (0,0001)	-0,295 (0,038)	0,688 (0,0001)	н/з	0,462 (0,001)	н/з
Содержание/активность в сыворотке крови:						
инсулина, $\text{мкМЕ}/\text{мл}$	-0,514 (0,0001)	-0,232 (0,097)	0,725 (0,0001)	н/з	0,515 (0,0001)	н/з
общего холестерина, $\text{мг}/\text{дл}$	-0,397 (0,004)	н/з	0,435 (0,002)	н/з	0,281 (0,048)	-0,336 (0,017)
холестерина ЛПВП, $\text{мг}/\text{дл}$	0,446 (0,001)	н/з	-0,38 (0,006)	н/з	-0,402 (0,004)	н/з
холестерина ЛПНП, $\text{мг}/\text{дл}$	-0,612 (0,0001)	н/з	0,510 (0,0001)	-0,266 (0,062)	0,404 (0,004)	-0,263 (0,065)
триглицеридов, $\text{мг}/\text{дл}$	-0,317 (0,025)	н/з	0,332 (0,019)	н/з	0,238 (0,097)	н/з
глюкозы натощак, $\text{ммоль}/\text{л}$	-0,512 (0,0001)	-0,238 (0,095)	0,532 (0,0001)	н/з	0,465 (0,001)	-0,243 (0,089)
общего белка, $\text{г}/\text{л}$	0,421 (0,002)	0,261 (0,067)	-0,471 (0,001)	н/з	-0,388 (0,005)	н/з
альбумина, $\text{г}/\text{л}$	0,420 (0,02)	н/з	-0,612 (0,0001)	н/з	-0,379 (0,007)	н/з
общего билирубина, $\text{мкмоль}/\text{л}$	-0,436 (0,002)	н/з	0,543 (0,0001)	н/з	0,382 (0,006)	н/з
прямого билирубина, $\text{мкмоль}/\text{л}$	-0,663 (0,0001)	-0,311 (0,028)	0,695 (0,0001)	н/з	0,649 (0,0001)	н/з
мочевой кислоты, $\text{мг}/\text{дл}$	-0,578 (0,0001)	н/з	0,533 (0,0001)	н/з	0,514 (0,0001)	н/з
креатинина, $\text{мкмоль}/\text{л}$	-0,272 (0,056)	-0,257 (0,071)	0,385 (0,006)	н/з	0,277 (0,05)	н/з
мочевины, $\text{ммоль}/\text{л}$	н/з	н/з	0,325 (0,021)	н/з	н/з	н/з
железа, $\text{мкмоль}/\text{л}$	-0,474 (0,001)	н/з	0,575 (0,0001)	н/з	0,432 (0,002)	н/з
АсАТ, $\text{Ед}/\text{л}$	-0,483 (0,0001)	н/з	0,624 (0,0001)	н/з	0,416 (0,003)	н/з
гамма-глутамилтранспептидазы, $\text{Ед}/\text{л}$	-0,619 (0,0001)	н/з	0,691 (0,0001)	0,26 (0,068)	0,515 (0,0001)	0,275 (0,053)
щелочной фосфатазы, $\text{Ед}/\text{л}$	-0,444 (0,001)	-0,296 (0,037)	0,415 (0,003)	н/з	0,431 (0,002)	н/з
Коэффициент Де Ритиса	-0,747 (0,0001)	н/з	0,612 (0,0001)	н/з	0,597 (0,0001)	н/з
Эластичность печени, кПа	-0,431 (0,002)	н/з	0,423 (0,002)	н/з	0,413 (0,003)	н/з
Индекс NAFLD liver fat score	0,54 (0,0001)	н/з	-0,692 (0,0001)	н/з	-0,491 (0,0001)	н/з

Примечание. АД — амплитуда деформации, $\times 10^{-6}$ м; ОПЖ — обобщенный показатель жесткости, $\times 10^{-6}$ Н/м; ОПВ — обобщенный показатель вязкости, $\times 10^{-1}$ Па·с; н/з — корреляция статистически незначима.

изменения гликозилированного гемоглобина на фоне частых и длительных эпизодов гипергликемии определяют увеличение «внутренней жесткости» эритроцитов [42].

Прямые корреляции установлены с уровнем холестерина ЛПВП, при этом сила связи оказалась невысокой ($r = 0,446$), поскольку тренды изменения данного показателя в группах оказа-

лись противоположными. Выявленные ассоциации между параметрами эритроцитов и липидного профиля не случайны, поскольку известно о тесном взаимодействии мембран эритроцитов с липидными компонентами плазмы крови с последующей модификацией структурно-функциональных параметров клеток [43]. Эритроциты способны адсорбировать на своей поверхности липопротеины плазмы крови, нагруженные холестерином [44]. Наиболее интенсивно протекает обмен холестерина между клетками красной крови и ЛПВП, при этом существенную роль играет лецитинхолестеринацилтрансфераза (ЛХАТ) сыворотки крови, синтез которой происходит в печени и в значительной степени определяется ее состоянием. Отсюда следует, что при диффузной патологии печени наблюдается снижение уровня ЛХАТ с последующим повышением содержания свободного холестерина в сыворотке крови и затем в эритроцитах. Это обеспечивается холестеринпонижающим феноменом эритроцитов, который, с одной стороны, влияет на интенсивность обмена холестерина между липопротеинами сыворотки и клетками крови, с другой — поддерживает в физиологических пределах содержание липида в эритроцитах. Нарушение этого биологически важного механизма регулирования обмена холестерина может приводить к гиперхолестеринемии, что является важным фактором риска в развитии атеросклероза, ИБС и, вероятно, влияет на способность эритроцитов к деформации [45].

Обратные ассоциации способности клеток к деформации с параметрами, отражающими синдром цитолиза, холестаза (активность АсАТ, АлАТ, гамма-глутамилтранспептидазы, щелочной фосфатазы, содержание железа, билирубина), и прямые взаимосвязи с показателями синтетической функции печени (содержание общего белка, альбумина) свидетельствуют о значимости состояния печени для вязкоупругих параметров эритроцитов, что также было показано нами ранее [23, 46, 47].

В настоящем исследовании эластичность печени обратно коррелировала с амплитудой деформации и прямо — с обобщенными показателями вязкости и жесткости. Данное обстоятельство обусловлено связью вязкоупругих параметров со степенью фиброза печени [48, 49]. Снижение способности клеток красной крови к деформации ассоциировано с уменьшением внутриэритроцитарного содержания АТФ и оксида азота NO, что, в свою очередь, нарушает активацию эндотелиальной NO-синтазы со снижением образования NO и последующей вазоконстрикцией [50]. Подобные обстоятельства усиливают гипоксию тканей, что является сти-

мулом для фиброгенеза, в том числе в печени. Обратная корреляция амплитуды деформации с индексом NAFLD liver fat score и прямые связи данного показателя с обобщенными вязкостью и жесткостью, вероятно, обусловлены учетом компонентов метаболического синдрома при его подсчете.

Проведенный анализ продемонстрировал перечень факторов, которые существенно влияют на амплитуду деформации, обобщенные вязкость и жесткость клеток крови. Можно ожидать, что при исследовании эритроцитов пациентов с неясным генезом ЖБП параметры эритроцитов окажутся сопоставимыми. Именно для различения этиологии процесса оказался информативным эксперимент *in vitro*: эритроциты, адаптированные к хроническому воздействию этанола у пациентов с АБП, находящихся в состоянии абстиненции, демонстрируют повышение способности к деформации со снижением обобщенных вязкости и жесткости после экспозиции с физиологическими низкими дозами этанола, в то время как эритроциты непьющих с НАЖБП с метаболическими нарушениями реагируют на этанол *in vitro* значительным снижением амплитуды деформации на фоне увеличения показателей жесткости и вязкости.

С учетом множества параметров, влияющих на вязкоупругие параметры эритроцитов, выполнена их стандартизация, после чего оценена возможность их применения для различения пациентов с НАЖБП и АБП с использованием метода Volcanoplot при условии FC >10 % и Т-тест <2,3×10⁻¹⁰ (рис. 2). С помощью методов главных компонент (РСА-анализ) и дискриминантного анализа (PLSDA) выявлены уровни показателей эритроцитов, позволяющие дифференцировать НАЖБП и АБП (рис. 3).

Совпадение начальных величин амплитуды деформации, вязкости и жесткости эритроцитов в группах с НАЖБП и АБП преодолевается после проведения эксперимента с раствором этанола *in vitro*, при котором тренды изменения параметров различны. Данный аспект обеспечивает высокую диагностическую точность различения пациентов с ЖБП различного генеза, что подтверждено методами Random Forest и SVM (рис. 4, а, б). Области под кривой (AUC), составляющие 0,999 (чувствительность 98 %, специфичность 99 %), свидетельствуют об отличной возможности дифференцирования пациентов с ЖБП при использовании совокупности вязкоупругих параметров эритроцитов, измеренных после экспозиции эритроцитов с раствором этанола. Это подтвердил анализ, выполненный с помощью перекрестной проверки среднего значения (РСР)

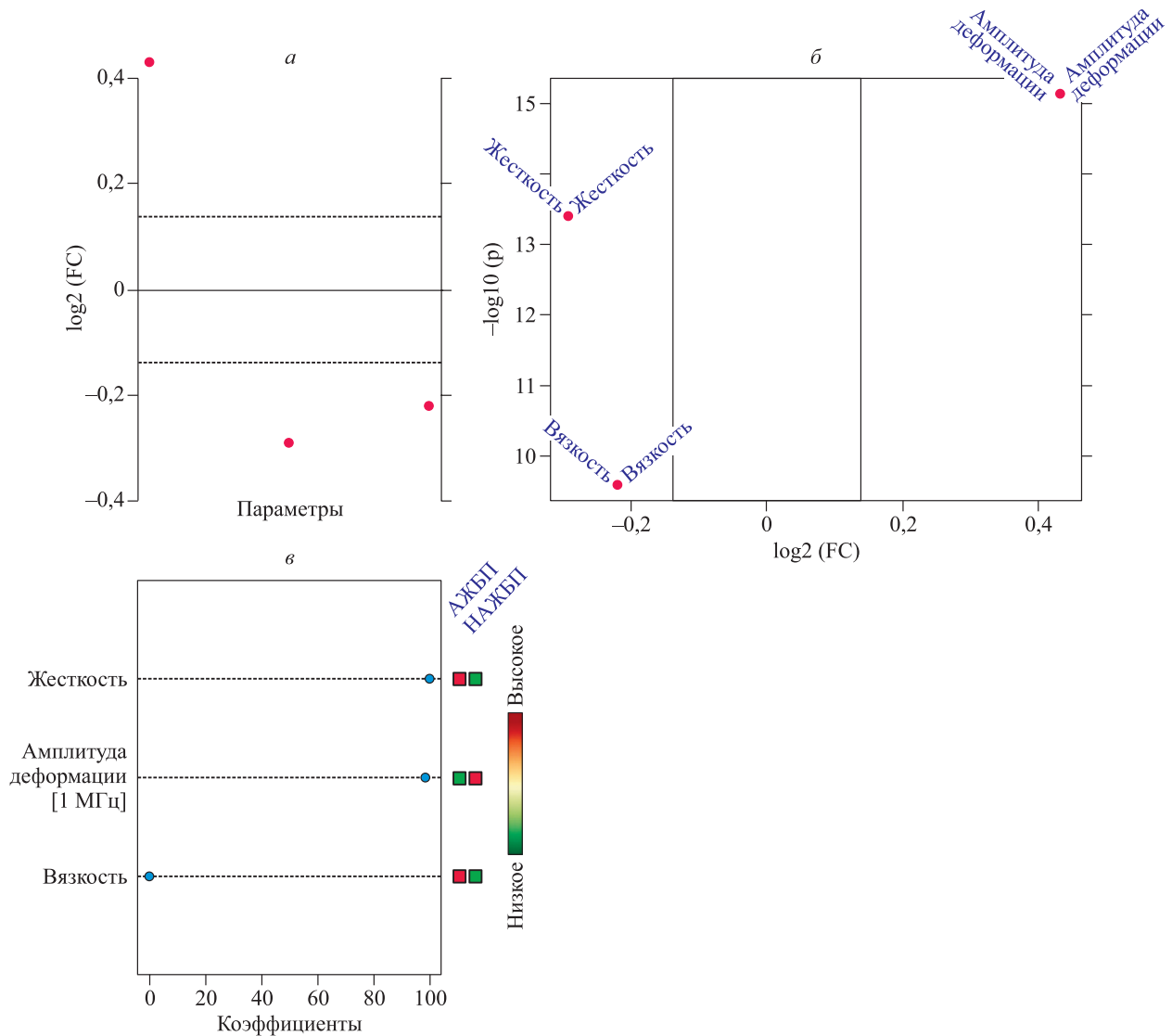


Рис. 2. Возможности различения пациентов с НАЖБП и АБП после стандартизации показателей с использованием метода Volcanoplot (а, б) и ранжирование вязкоупругих параметров эритроцитов по их вкладу в различие НАЖБП и АБП с использованием PLSDA-анализа (в)

для каждого образца с использованием лучшего классификатора (на основе AUC) с предоставлением матрицы несоответствий (рис. 4, в).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выполненное исследование демонстрирует высокий диагностический потенциал предложенного ранее метода дифференциальной диагностики ЖБП алкогольного и неалкогольного генеза с использованием экспозиции эритроцитов пациентов с раствором этанола *in vitro*. Изучение изменений вязкоупругих параметров эритроцитов (амплитуды деформации, обобщенных

показателей вязкости и жесткости) пациентов с жировой болезнью печени неясного генеза в ходе такого эксперимента позволило выделить две группы с диаметрально противоположными трендами. Группа со снижением амплитуды деформации эритроцитов на фоне нарастания обобщенных вязкости и жесткости состояла преимущественно из пациентов с метаболическим синдромом, не пьющих или эпизодически употребляющих алкоголь в низких дозах (менее 20 г в пересчете на чистый этанол). Группа с увеличением деформируемости эритроцитов при снижении обобщенных вязкости и жесткости включала в себя систематических потребителей

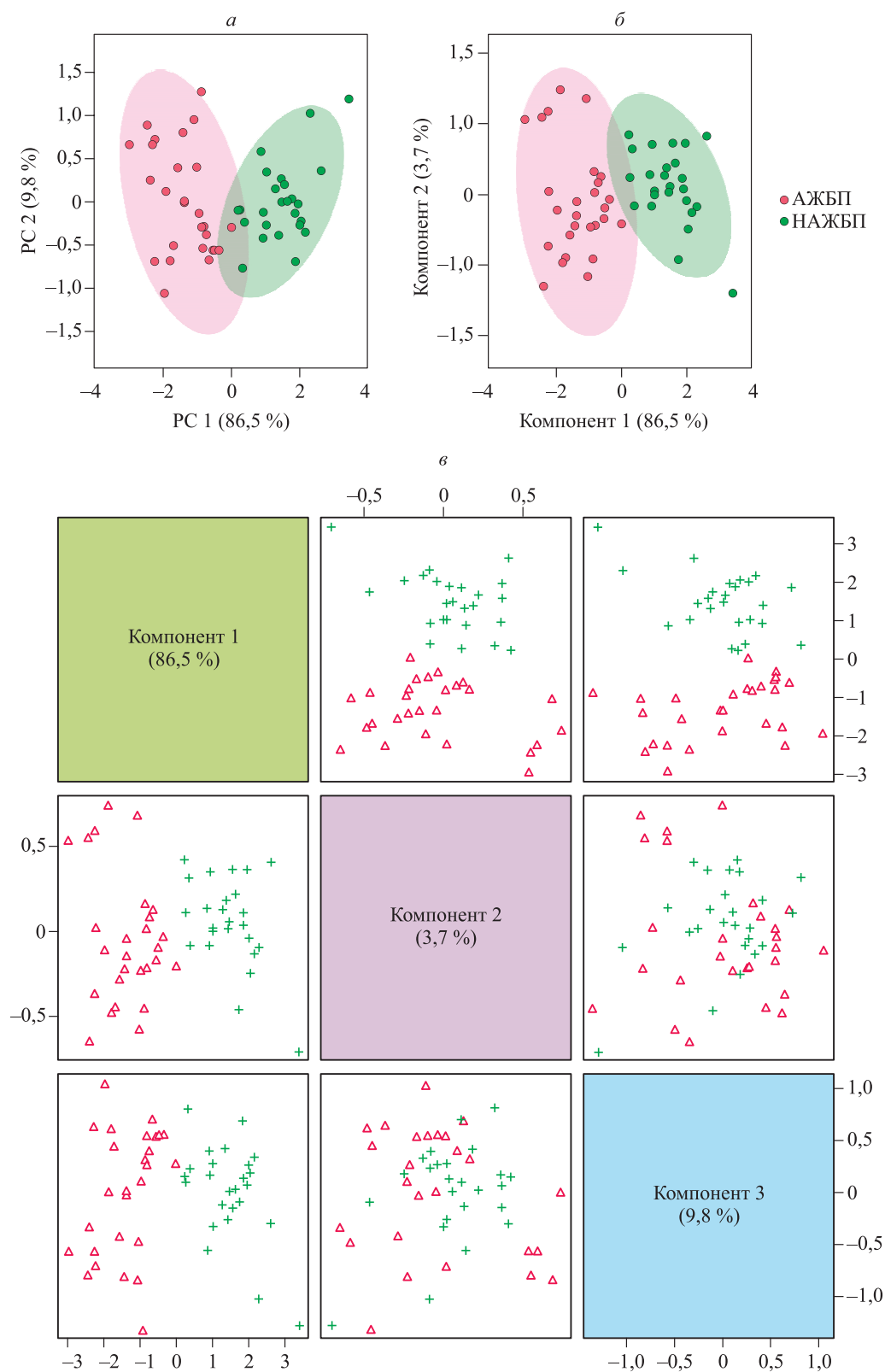


Рис. 3. Паттерны уровней вязкоупругих параметров эритроцитов, полученные с помощью метода PCA (а, б) и PLS-DA-анализа (в), у пациентов с НАЖБП и АБП

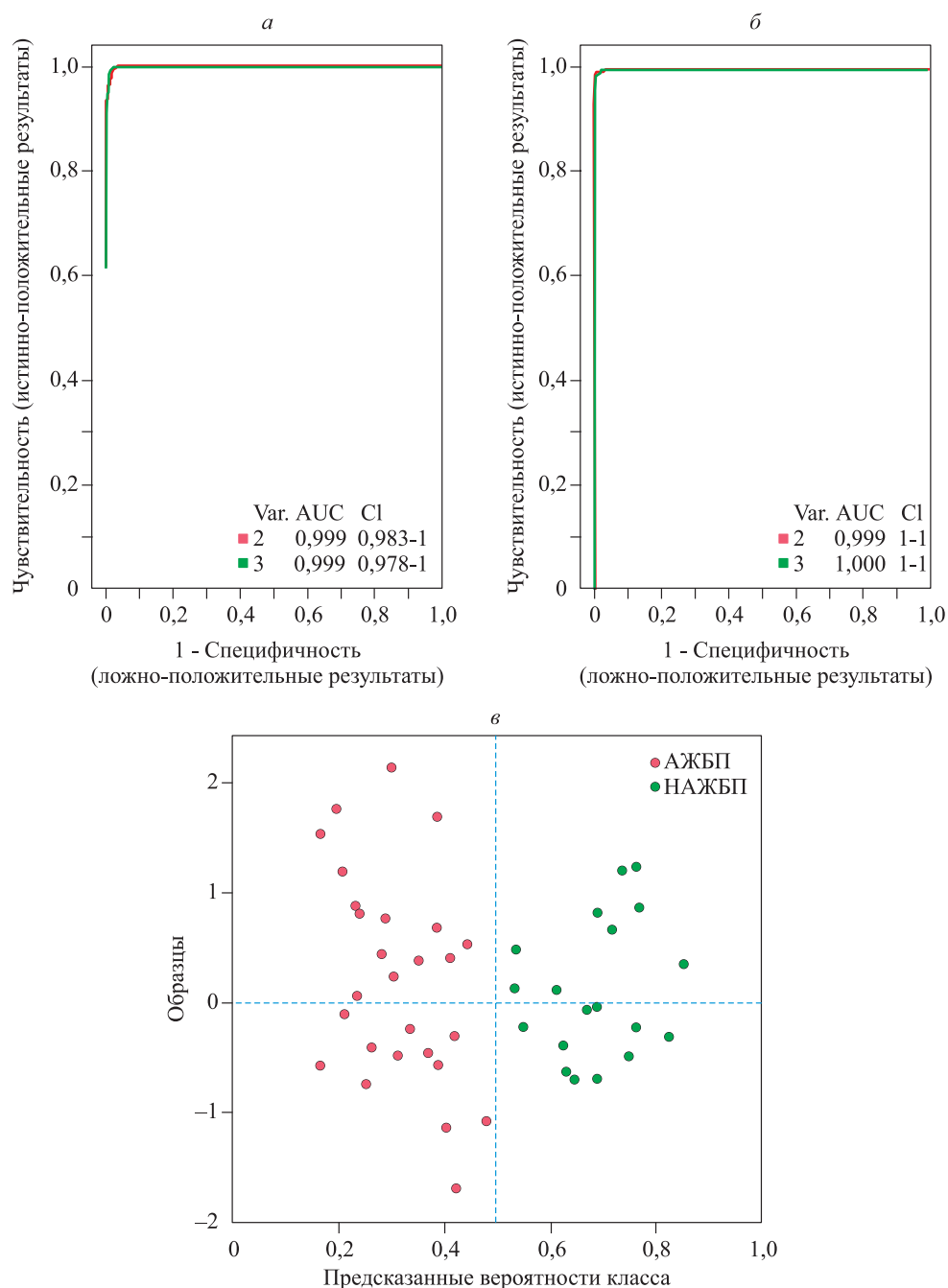


Рис. 4. Диагностическая точность различения НАЖБП и АБП с использованием методов Random Forest (а) и SVM (б), предсказательный потенциал модели при использовании перекрестной проверки среднего значения (PCP) для каждого образца с учетом лучшего классификатора (на основе AUC) с предоставлением матрицы несоответствий (в)

алкоголя, находившихся в состоянии абстиненции. У лиц данной группы экспозиция *in vitro* с этанолом, являющимся важным энергетическим субстратом, встроенным в метаболические процессы, приводила к нарастанию амплитуды деформации клеток.

Установлены корреляции вязкоупругих параметров эритроцитов со стилем потребления алкоголя, компонентами метаболического синдрома, показателями липидного профиля, печеночными пробами. Выявлены прямые ассоциации амплитуды деформации эритроцитов с уровнем

холестерина ЛПВП и обратные — с содержанием общего холестерина, холестерина ЛПНП, триглицеридов; обобщенные показатели вязкости и жесткости коррелировали с концентрацией данных липидов инверсно по сравнению с амплитудой деформации.

Учитывая множество факторов, влияющих на параметры эритроцитов, выполнена стандартизация показателей, с помощью методов Volcanoplot и PLSDA показана возможность различения пациентов с НАЖБП и АБП, а также проведено ранжирование вязкоупругих параметров эритроцитов по их вкладу в дифференцирование больных с ЖБП. Диагностическая точность различения НАЖБП и АБП при использовании методов Random Forest и SVM составила 99 % с чувствительностью 98 % и специфичностью 99 %. Предсказательный потенциал созданной модели подтвержден перекрестной проверкой среднего значения для каждого образца с применением лучшего классификатора (на основе AUC 0,99) и предоставлением матрицы несоответствий.

Предложенный способ подтвердил свой высокий потенциал для дифференциальной диагностики ЖБП алкогольного и неалкогольного генеза.

Работа выполнена в рамках темы «Эпидемиологический мониторинг состояния здоровья населения и изучение молекулярно-генетических и молекулярно-биологических механизмов развития распространенных терапевтических заболеваний в Сибири для совершенствования подходов к их диагностике, профилактике и лечению» ГЗ № 0324-2018-0001, Рег. № АААА-А17-117112850280-2.

ЛИТЕРАТУРА

- Ивашкин В.Т., Драпкина О.М., Маев И.В., Труханов 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. *Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*, 2015; (6): 31–41.
- Ivashkin V.T., Drapkina O.M., Maev I.V., Troukhanov A.S., Zimovina U.V., Palgova L.K., Blinov D.V., Shirokova E.N., Tsukanov V.V. Non-alcoholic fatty liver disease risk factors assessment among the general practitioners and gastroenterologist's patients flow. *United Eur. Gastroenterol. J.*, 2015; 3(1): 344–345.
- McCullough A.J. Epidemiology of the metabolic syndrome in the USA. *J. Dig. Dis.*, 2011; 12 (5): 333–340.
- Вельков В.В. Неинвазивные биомаркеры фиброза. До свидания, биопсия? *Клинико-лабораторный консилиум*, 2009; (5): 34–44.
- Balmer M.L., Dufour J.F. Non-alcoholic steatohepatitis — from NAFLD to MAFLD. *Ther. Umsch.*, 2011; 68 (4): 183–188.
- Zhou Y.J., Li Y.Y., Nie Y.Q., Huang Ch.M., Cao Ch.Y. Natural course of nonalcoholic fatty liver disease in southern China: a prospective cohort study. *J. Dig. Dis.*, 2012; 13 (3): 153–160. doi: 10.1111/j.1751-2980.2011.00571.x
- Weinstein G., Zelber-Sagi S., Preis S.R., Beiser A.S., DeCarli Ch., Speliotes E.K., Satizabal C.L., Vasan R.S., Seshadri S. Association of nonalcoholic fatty liver disease with lower brain volume in healthy middle-aged adults in the Framingham Study. *JAMA Neurol.*, 2017; 75 (1): 97–104. doi: 10.1001/jamaneurol.2017.3229
- Niederseer D., Wernly S., Bachmayer S., Wernly B., Bakula A., Huber-Schönauer U., Semmler G., Schmied C., Aigner E., Datz C. Diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is independently associated with cardiovascular risk in a large austrian screening cohort. *J. Clin. Med.*, 2020; 9: 1065–1067. doi: 10.3390/jcm9041065
- Jia Y., Ji P., Nguyen L., French B., Tillman B., French S. Different roles of epigenetic regulators and inflammasome in hepatocellular carcinoma tumorigenesis in patients with ASH vs. NASH. *Exp. Biol.*, 2019; A67: 662–667.
- Hajifathalian K., TorabiSagvand B., McCullough A.J. Effect of alcohol consumption on survival in nonalcoholic fatty liver disease: A national prospective cohort study. *Hepatology*, 2018; 70 (2): 511–521. doi: 10.1002/hep.30226
- EASL–EASD–EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. Clinical Practice Guidelines. *J. Hepatology*, 2016; 64 (6): 1388–1402. doi: 10.1016/j.jhep.2015.11.004
- Ивашкин В.Т., Маевская М.В., Павлов Ч.С., Тихонов И.Н., Широкова Е.Н., Буевров А.О., Драпкина О.М., Шутьпекова 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. *Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*, 2016; 26 (2): 24–42. doi: 10.22416/1382-4376-2016-26-2-24-42
- Liao Y.Y., Yang K.C., Lee M.J., Huang K.C., Chen J.D., Yeh C.K. Multifactor analysis of an ultrasound quantitative diagnostic index for classifying nonalcoholic fatty liver disease. *Sci. Rep.*, 2016; 6: 35083. doi: 10.1038/srep35083
- Подымова С. Д. Болезни печени: Руководство для врачей. 5-е изд., перераб. и доп. М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2018. 984 с.
- Терновой С.К., Ширяев Г.А., Устюжанин Д.В., Абдурахманов Д.Т. Определение содержания жира в печени у пациентов с жировым гепатозом и стеатогепатитом методом протонной МР-спектроскопии. *Мед. визуализация*, 2018; (4): 50–58. doi: 10.24835/1607-0763-2018-4-50-58
- Ивашкин В.Т. Фиброз печени. Ред. В.Т. Ивашкин, Ч.С. Павлов. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. 168 с.

17. Ивашкин В.Т., Шульпекова Ю.О. Неалкогольный стеатогепатит. *Болезни органов пищеварения*, 2000; (2): 41–46.
18. Шерлок Ш., Дули Дж. Заболевания печени и желчных путей: практическое рук. Пер. с англ. Ред. З.Т. Апросина, Н.А. Мухин. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2002. 859 с.
19. Lee S.Y., Park H.J., Best-Popescu C., Jang S., Park Y.K. The effects of ethanol on the morphological and biochemical properties of individual human red blood cells. *PLoS One*, 2015; 10 (12): e0145327.
20. Savage D.G., Ogundipe A., Allen R.H., Stabler S.P., Lindenbaum J. Etiology and diagnostic evaluation of macrocytosis. *Am. J. Med. Sci.*, 2000; 319 (6): 343–352.
21. Wakabayashi I. Relationships of habitual alcohol intake with erythrocyte-related indices in middle-aged Japanese men. *Acta Haematol.*, 2019; 142: 154–161. doi: 10.1159/000499102
22. Lichtin A.E. What evaluation should be done for an apparently healthy patient with an increased mean corpuscular volume (MCV)? *Cleve. Clin. J. Med.*, 2001; 68 (5): 381–386. doi: 10.3949/ccjm.68.5.381
23. Кручинина М.В., Паруликова М.В., Курилович С.А., Громов А.А., Генералов В.М. Изменение параметров эритроцитов у пациентов с жировой болезнью печени алкогольного и неалкогольного генеза в динамике абстинентного синдрома и снижения массы тела. *Эксперим. и клин. гастроэнтерология*, 2017; (9): 106–115.
24. Кручинина М.В., Паруликова М.В., Громов А.А., Генералов В.М., Генералов К.В., Кручинин В.Н., Рыхлицкий С.В., Кручинина Э.В., Шувалов Г.В. Острое воздействие этанола на эритроциты *in vitro*: новый подход к дифференциальной диагностике жировой болезни печени. *Эксперим. и клин. гастроэнтерология*, 2019; (12): 122–134. doi: 10.31146/1682-8658-ecg-172-12-122-134
25. Пат. № 2697202 РФ. Способ дифференциальной диагностики жировой болезни печени алкогольного и неалкогольного генеза. Кручинина М.В., Генералов В.М., Паруликова М.В., Курилович С.А., Громов А.А., Генералов К.В., Сафатов А.С., Буряк Г.А., Шувалов Г.В. *Бюл.* 2019, № 23.
26. Dietrich C.F., Bamber J., Berzigotti A., Bota S., Cantisani V., Castera L., Cosgrove D., Ferraioli G., Friedrich-Rust M., Gilja O.H., Goertz R.S., Karlas T., de Knegt R., de Ledingham V., Piscaglia F., Procopet B., Saftoiu A., Sidhu P.S., Sporea I., Thiele M. EFSUMB guidelines and recommendations on the clinical use of liver ultrasound elastography, Update 2017 (Long Version). *Ultraschall Med.*, 2017. 38 (4): e16–e47. doi: 10.1055/s-0043-103952
27. Генералов В.М., Кручинина М.В., Дурманов 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.
28. Махов В.М. Алкогольная болезнь печени и неалкогольная жировая болезнь печени – общность и различия. *Лечащий врач*, 2012; (7): 22–28.
29. Хомерики С.Г., Хомерики Н.М. Алкогольная болезнь печени: механизмы развития, морфологические проявления, дифференциальная диагностика и патогенетические подходы к терапии. *Consilium medicum*, 2012; (1): 27–34.
30. Ивашкин В.Т., Маевская М.В., Павлов Ч.С., Сиволуп Ю.П., Луньков В.Д., Жаркова М.С., Масленников Р.В. Клинические рекомендации Российского общества по изучению печени по ведению взрослых пациентов с алкогольной болезнью печени. *Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии*. 2017; 27 (6): 20–40.
31. Khang A.R., Lee H.W., Yi D.W., Kang Y.H., Son S.M. 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. doi: 10.2147/DMSO.S189544
32. Сторожок С.А., Панченко Л.Ф., Филиппович Ю.Д., Глушков В.С. Изменения физико-химических свойств биологических мембран при развитии толерантности к этанолу. *Вопр. мед. химии*, 2001; (2): 42–51.
33. Maturu P., Reddy V.D., Padmavathi P., Varadacharyulu N. Ethanol induced adaptive changes in blood for the pathological and toxicological effects of chronic ethanol consumption in humans. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 2012; 64: 697–703.
34. Tóth M. E., Vigh L., Sántha M. Alcohol stress, membranes and chaperones. *Cell Stress Chaperones*, 2014; 19: 299–309.
35. Maturu P., Vaddi D.R., Pannuru P., Nallanchakravarthula V. Modifications of erythrocyte membrane proteins, enzymes and transport mechanisms in chronic alcoholics: an in vivo and in vitro study. *Alcohol Alcohol.*, 2013; 48: 679–686.
36. Tyulina O.V., Prokopieva V.D., Boldyrev A.A., Johnson P. Erythrocyte and plasma protein modification in alcoholism: A possible role of acetaldehyde. *Biochim. Biophys. Acta*, 2006; 1762 (5): 558–563.
37. Chu H., Breite A., Ciralo P., Franco R.S., Low P.S. Characterization of the deoxyhemoglobin binding site on human erythrocyte band 3: implications for O₂ regulation of erythrocyte properties. *Blood*, 2008; 111 (2): 932–938. doi: 10.1182/blood-2007-07-100180
38. Ярыгина Е.Г., Прокопьева В.Д. Изменение стабильности эритроцитов в присутствии различных концентраций этанола и ацетальдегида. *Сиб. вестн. психиатрии и наркологии*, 2005; (4): 14–16.
39. Osna N.A., Donohue T.M., Kharbanda K.K. Alcoholic liver disease: pathogenesis and current management. *Alcohol Res.*, 2017; 38 (2): 7–21.
40. Fernando H., Bhopale K.K., Kondraganti S.S., Kaphalia B., Ansari G. Alcohol-induced hepatic steatosis: A comparative study to identify possible indicator(s) of alcoholic fatty liver disease. *J. Drug Alcohol. Res.*, 2018; 7: 236040. doi: 0.4303/jdar/236040
41. Haffner S.M., Gingerick R., Stern M.P., Bowsher R.R., Miettinen H. Principal proinsulin and specific insulin are associated with the source of diabetes among the Mexicans, not diabetes. *J. Diabetes*, 1995; 44 (10): 1156–1160.
42. Шилов А.М., Авшалумов А.Ш., Синицина Е.Н., Марковский В.Б., Полещук О.И. Изменения реологических свойств крови у больных с метабо-

- лическим синдромом. *Рус. мед. журн.*, 2008; (4): 200–204.
43. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А. Физиология и патофизиология эритроцита. Томск: Из-во Том. ун-та, 2004. 202 с.
44. Леонова Т.Я. К вопросу об эритроцитарном механизме регулирования холестеринемии при экспериментальной гиперхолестеринемии и ишемической болезни сердца. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Новосибирск, 1982. 22 с.
45. Шиффман Ф. Дж. Патофизиология крови. Пер с англ. Е.Б. Жибурта, Ю.Н. Токарева М.; СПб.: Издательство БИНОМ: Невский диалог, 2000. 448 с.
46. Kruchinina M.V., Kurilovich S.A., Gromov A.A., Generalov V.M., Kruchinin V.N. Peculiarities of erythrocytic parameters in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *J. Anal. Sci., Methods and Instrumentation*. 2016; 6 (1): 6–14. doi: 10.4236/jasmi.2016.61002
47. Кручинина М.В., Паруликова М.В., Курилович С.А., Громов А.А., Генералов В.М., Рихтер В.А., Семенов Д.В., Морозов С.В., Соколова А.С., Салахудинов Н.Ф., Шашков М.В., Сидельников В.Н., Кручинин В.Н. Ассоциации функциональных параметров эритроцитов со структурой их мембран у мужчин г. Новосибирска с атерогенными дислипидемиями и алкогольным поражением печени. *Атеросклероз*, 2017; 13 (3): 5–13.
48. Kruchinina M., Voevoda M., Peltek S., Kurilovich S., Gromov A., Kruchinin V., Rykhlytsky S., Volodin V., Generalov V. Application of optical methods in blood studies upon evaluation of severity rate of diffuse liver pathology. *J. Anal. Sci., Methods and Instrumentation*, 2013; 3 (2): 115–123. doi: 10.4236/jasmi.2013.32014
49. Kruchinina M., Voevoda M., Peltek S., Kurilovich S., Gromov A., Kruchinin V., Rykhlytsky S., Volodin V., Generalov V., Shuvalov G. Comment on optical methods in blood studies upon evaluation of severity rate of diffuse liver pathology. *Int. J. New Technol. Res.*, 2016; 2 (4): 7–12.
50. Зинчук В.В. Деформируемость эритроцитов: физиологические аспекты. *Успехи физиол. наук*, 2001; 32 (3): 66–78.

POSSIBILITIES OF THE METHOD OF DIELECTROPHORESIS OF ERYTHROCYTES IN DISTINCTION OF PATIENTS WITH FATTY LIVER DISEASE OF ALCOHOLIC AND NON-ALCOHOLIC GENESIS

M.V. Kruchinina¹, M.V. Parulikova¹, S.A. Kurilovich¹, A.A. Gromov¹,
V.M. Generalov², V.N. Kruchinin³, S.V. Rykhlytsky³, A.A. Shestov⁴

¹Research Institute of Internal and Preventive Medicine – Branch of Federal Research Center
Institute of Cytology and Genetics of SB RAS
630089, Novosibirsk, Boris Bogatkov str., 175/1

²State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector»
630559 Novosibirsk region, Koltsovo

³Rzhanov Institute of Semiconductor Physics of SB RAS
630090 Novosibirsk, Academician Lavrentev av., 13

⁴Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, USA

The aim of the work is to study the possibilities of distinguishing between men with fatty disease of alcoholic and non-alcoholic origin using the viscoelastic parameters of erythrocytes - deformation amplitude, summerized indicators of viscosity and rigidity (baseline and after exposure to ethanol in vitro) obtained using the method of erythrocyte dielectrophoresis; to determine associations of the amplitude of deformation, summerized viscosity and rigidity of erythrocytes with blood lipid levels. The study involved 54 men ($44,62 \pm 1.52$ years) with fatty liver disease according to ultrasound of the abdominal organs, the severity of fibrosis corresponded to 0-1 (FibroScan® 502 Echosens, France). All patients underwent a study of the viscoelastic parameters of erythrocytes - the amplitude of deformation, summerized indicators of viscosity and rigidity by the dielectrophoresis method: the baseline level of indicators was determined, as well as their values after exposure of red blood cells with 10 μ l of 0,0 2% ethanol solution in vitro for 300 s. The dynamics of changes in the viscoelastic parameters of erythrocytes during the experiment with alcohol in patients with fatty liver disease of unknown origin made it possible to highlight two groups with diametrically opposite trends in erythrocyte indices. The group with a decrease in the amplitude of erythrocyte deformation against the background of an increase in summerized viscosity and rigidity ($n = 26$) consisted mainly of patients with metabolic syndrome who do not drink or occasionally consume alcohol in low doses (less than 20 g in terms of pure ethanol). Group with increased erythrocyte deformability and decrease in summerized viscosity and rigidity ($n = 28$) includes systematic alcohol consumers who were in a state of

abstinence. Ethanol exposure, important energy substrate of this group, built into metabolic processes, led to an increase in the amplitude of cell deformation. Correlations of the viscoelastic parameters of erythrocytes with the style of alcohol consumption, components of the metabolic syndrome, lipid profile indicators, and liver tests were established. Direct associations of the amplitude of erythrocyte deformation with the level of HDL cholesterol and inverse - with the values of total cholesterol, LDL cholesterol, triglycerides were identified. Summarized viscosity and rigidity correlated with the levels of these lipid indicators inversely compared with the amplitude of deformation. The diagnostic accuracy of distinguishing between NAFLD and AFLD using models, including the viscoelastic parameters of erythrocytes and their changes after exposure to ethanol, using Random Forest and SVM methods reached 99 %, sensitivity of 98 % and specificity of 99 %.

Keywords: fatty liver disease, etiology, differential diagnosis, erythrocytes, dielectrophoresis, ethanol, acute exposure.

*Статья поступила 10 октября 2020 г.
Принята к печати 2 ноября 2020 г.*