



С.А. Курилович¹, М.В. Кручинина¹,
А.А. Громов¹, В.М. Генералов², Т.С. Бакиров²,
В.А. Рихтер³, Д.В. Семенов³,
М.М. Шакиров⁴, С.В. Морозов⁴

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт терапии» СО РАН, Новосибирск

² Федеральное государственное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии „Вектор“» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, НСО, пос. Кольцово

³ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

⁴ Институт органической химии СО РАН, Новосибирск

Особенности параметров эритроцитов при циррозах печени: эритроциты — «свидетели» или «виновники» прогрессирования фиброза печени?

Ключевые слова

Цирроз печени, фиброз, эритроцит, фосфолипиды мембран, диэлектрофорез, ЯМР-спектроскопия.

В проблеме диффузных поражений печени особая роль отводится степени фиброза и скорости его прогрессирования, поскольку именно они определяют прогноз болезни и выбор терапии. Множество этиологических факторов (вирусы гепатитов, алкоголь, аутоиммунные реакции, генетически обусловленные метаболические нарушения) приводят к развитию фиброза печени, отступая впоследствии на второй план. Причины, приводящие к дальнейшему прогрессированию фиброза до его выраженной степени — цирроза, во многом остаются неясными. Интересна в данном аспекте роль эритроцитов, которые, с одной стороны, отражая состояние мембран гепатоцитов [15], являются «свидетелями» нарастающего фиброза. С другой стороны, изменение их параметров само по себе может привести к прогрессированию этого процесса. В таком случае клетки красной крови, приводя к нарушениям микроциркуляции и тканевой гипоксии, выступают как «виновники» развития цирроза печени. Данные ряда исследователей [1, 7], указывающие на возможность обратного раз-

вития фиброза, даже на стадии цирроза печени, заставляют задуматься о новых подходах к терапии. Возможно, воздействие на клетки красной крови, улучшение их вязко-упругих параметров будет тем самым фактором, который способствует регрессу фиброза печени.

Цель работы — изучить особенности вязко-упругих и электрических характеристик эритроцитов, их фосфоросодержащих метаболитов в сопоставлении со структурными изменениями мембран клеток при циррозе печени.

Материалы и методы

Обследовано 37 мужчин в возрасте от 47 до 62 лет с циррозом печени различного генеза: HBV — 10 пациентов, HCV — 8, HBV+HCV — 7, в том числе 14 пациентов, у которых хроническая вирусная инфекция протекала на фоне алкогольной интоксикации, алкогольный — 10 человек, у 2 пациентов цирроз печени был расценен как криптогенный. Вирусную этиологию болезни устанавливали на основании обнаружения серологических маркеров и/или ДНК и РНК ви-

русов, а алкогольную — при отрицательных результатах ИФА сывороточных маркеров вирусных гепатитов и достоверно подтвержденном систематическом потреблении алкоголя. Стадию болезни определяли на основании клинических, биохимических и инструментальных исследований. У 16 больных выполнена биопсия печени. Степень компенсации цирроза печени соответствовала классам А и В по Чайлд-Пью (преимущественно класс В — в 88,4 % случаев).

Группу сравнения составили 33 практически здоровых мужчины в возрасте от 35 до 60 лет, ведущие здоровый образ жизни и употребляющие алкоголь не чаще 1–2 раз в месяц в умеренных дозах, у которых при клиническом, лабораторном и инструментальном обследовании не выявлено признаков заболевания печени.

Обследование выполнено с одобрения Комитета биомедицинской этики ГУ НИИ терапии СО РАМН. Получено информированное согласие всех пациентов на участие в обследовании.

Все обследуемые заполняли стандартную анкету о частоте и дозах потребляемого алкоголя.

У больных с верифицированными диагнозами, а также у мужчин группы сравнения исследованы морфометрия, структурно-функциональные параметры эритроцитов методами диэлектрофореза (патент на изобретение № 2296327 от 30.08.2004 г.), тонкослойной и газовой хроматографии, макроэргические соединения эритроцитов — методом ^{31}P ЯМР-спектроскопии.

Для проведения исследований кровь объемом 2 мл забирали вокутайнерами в 3,7 % цитратный буфер в соотношении 9 : 1. Через 1 ч кровь вносили в 0,3 М раствор сахарозы (рН 7,36) в соотношении 1 : 20. Сразу после разведения эритроцитов проводили измерения. В измерительной ячейке на клетки воздействовали неоднородным переменным электрическим полем (НПЭП) со следующими параметрами: напряженность электрического поля — 10^5 В/м, градиент напряженности электрического поля — 10^{11} В/м², частотный диапазон — $5 \cdot 10^4$ – $1 \cdot 10^6$ Гц. Изучение электрических и вязко-упругих характеристик эритроцитов проводили на четырех фиксированных частотах. Оценивали электропроводность мембран, индексы агрегации и деструкции эритроцитов, емкость мембран клеток, скорость движения эритроцитов к электродам, положение равновесной частоты, амплитуду деформации эритроцитов, поляризуемость клеток, обобщенные показатели вязкости и жесткости. Для распознавания образа клеток и компьютерной обработки данных использовали пакет оригинальных программ CELLFIND. Ошибка воспроизводимости метода — 7–12 %.

Определение фосфолипидов в эритроцитах проводили методом двумерной тонкослойной хроматографии по методу Э. Шталь (1965) [4]. Определение 5 фракций фосфолипидов (фосфатидилэтаноламина, фосфатидилхолина, сфингомиелина, фосфатидилсерина, лизофосфатидилхолина) осуществляли на пластинах Kissellgell Merck F254 (Германия) в системе растворителей хлороформ : метанол : 28 % водный аммиак (50 : 35 : 5). При оценке результатов учитывали величину относительной подвижности отдельных фракций фосфолипидов на пластине. Количественное определение фракций фосфолипидов проводили после сжигания органической части по содержанию неорганического фосфора. Для определения неорганического фосфора использовали унифицированный метод (В.В. Меньшиков, 1987) [6]. Содержание холестерина мембран эритроцитов определяли методом Златкиса — Зака (1969) [4]. Липиды мембран, полученные трехкратным гемолизом эритроцитов дистиллированной водой, выделяли методом J. Folsh и соавт. (1957) [4]. Общее содержание липидов в мембранах эритроцитов определяли по методу W. Bloog в модификации J. Brandon (1969) [4]. Спектр нейтральных липидов оценивали методом тонкослойной хроматографии на пластинах Sorbfil (Россия) в системе гептан : диэтиловый эфир : этилацетат (80 : 20 : 5). Фракции липидов идентифицировали с помощью соответствующих стандартов (Sigma, США).

Определение жирнокислотного состава мембран эритроцитов проводили методами газо-хроматографического и хромато-масс-спектрометрического анализа метиловых эфиров жирных кислот, получаемых омылением липидов с последующей этерификацией жирных кислот метилатом натрия в метиловом спирте [4].

Анализ жирных кислот выполняли на хроматографе HP 6890 (Hewlett Packard, США), снабженном кварцевой капиллярной колонкой HP-5 (30 м × 0,32 мм, толщина жидкой фазы — 0,25 мкм) и пламенно-ионизационным детектором. Как газ-носитель использовали гелий. Температуру колонки изменяли по следующей программе: 2 мин при 50 °С, подъем температуры до 280 °С с линейной скоростью 5 °С/мин и 10 мин при 280 °С. Температура детектора камеры для отбора пробы — 280 °С. Для обработки хроматограмм использовали программу Chemstation. Состав жирных кислот рассчитывали методом внутренней нормализации, содержание отдельных жирных кислот представляли в процентах от суммы всех жирных кислот.

Хромато-масс-спектрометрический анализ проводили на газовом хроматографе HP 6890A, снаб-

женном капиллярной колонкой HP-5МС и масс-селективным детектором HP 5972А (Hewlett Packard, США). Использовали кварцевую капиллярную колонку HP-5, описанную выше. Идентификацию метиловых эфиров жирных кислот проводили по времени удерживания образцов и путем сопоставления экспериментальных масс-спектров с масс-спектрами из базы данных NIST CSD (275 000 соединений) с помощью системы обработки данных Chemstation.

^{31}P ЯМР-спектры записывали на ЯМР-спектрометре DRX 500 (Bruker, Германия) со следующими характеристиками: частота — 202,46 МГц, количество накоплений спектров — 1024, время задержки между накоплениями — 2 с, развертка — 80 миллионов долей (м. д.). Для накопления и обработки спектров использовали программу XWIN-NMR 3.1. Химические сдвиги отсчитывали от внутреннего стандарта — 2,3-дифосфоглицерата (2,3-ДФГ) (химический сдвиг: 3,3 м. д. для 3-Р и 2,6 м. д. для 2-Р). Высоту пиков спектров оценивали в процентном отношении к максимальному по высоте пику спектра. Ширину пиков измеряли в герцах. Интегральные интенсивности (площади резонансов) рассматривали как относительные величины (производные от площади реперного пика спектра, принятого за единицу площади).

Статистическую обработку данных выполняли с использованием программы SPSS 10. Достоверность различия показателей оценивали по критериям Стьюдента и Пирсона в случае, если распределение подчинялось нормальному закону; в случае отклонения распределения от нормального закона использовали непараметрические критерии (U-критерий Манна — Уитни, Колмогорова — Смирнова).

Результаты и обсуждение

По показателям морфометрии установлено следующее соотношение эритроцитов в группе сравнения: дискоциты — 80–85 %, деформированные — 5–10 %, сфероциты — 10 %. Для исходной картины морфологии крови у больных с циррозами было характерно понижение содержания нормальных двояковогнутых эритроцитов (дискоцитов) до 35–40 % от общего числа эритроцитов. Количество деформированных эритроцитов составляло 20–25 %, сфероцитов — 25–30 %, асимметричных и двоямочных — 15 % ($p < 0,0001$). Отмечено набухание почти всех типов эритроцитов вследствие нарушения осмотического равновесия в крови. После воздействия НПЭП практически все эритроциты у больных с циррозами в течение 30 с необратимо приобретали форму сфероцитов.

По данным литературы, известно, что двояковогнутую форму эритроциты способны поддерживать лишь при достаточном уровне внутриклеточных макроэргических фосфоросодержащих соединений [6]. Выраженные морфологические изменения клеток красной крови при циррозах заставили предположить существенные изменения уровня и соотношения внутриклеточных фосфорорганических компонентов.

На рис. 1 представлен типичный ^{31}P ЯМР-спектр взвеси эритроцитов с обозначением основных пиков. Основными компонентами спектра являются сигналы при 3,8 м. д. (3-Р) и 3,02 м. д. (2-Р) 2,3-ДФГ. Заметными представляются резонансы неорганических фосфатов неорганического фосфора (2,65 м. д.) и резонансы монофосфатов (аденозинмонофосфата [АМФ], инозинмонофосфата [ИМФ] и др.) — 4,5–4,7 м. д., пирофосфата (4,18 м. д.). Меньшей интенсивностью отличаются сигналы три- и дифосфатов: трирезонанса аденозинтрифосфатов (γ -АТФ, γ -уридинтрифосфат [УТФ] при –5,6 м. д.; α -АТФ, α -УТФ при –10,06 м. д.; β -АТФ, β -УТФ при –19,6 м. д.). Пиками микроокружения γ -АТФ и α -АТФ являются резонансы гемоглобин-АТФ (–4,5 м. д.), β -АДФ, УДФ, инозиндифосфат (–6,2 м. д.), α -АДФ, УДФ, инозиндифосфат (–9,9 м. д.), Mg-АТФ (–10,7 ... –11,0 м. д.). Кроме того, при –3,13 м. д. регистрируются незначительно выраженные пики фосфокреатина, при –14,1 м. д. — сигналы замещенных пирофосфатов.

При исследовании методом ^{31}P ЯМР-спектроскопии эритроцитов у пациентов с циррозами печени отмечено достоверное повышение интенсивности пиков, отражающих резонансы глюкозо-6-фосфатов, АМФ, ИМФ, пирофосфатов, 2,3-ДФГ и понижение пиков, представляющих резонансы неорганических фосфатов и фосфокреатина, γ -, α - и β -АТФ, γ -, α - и β -УТФ, Нв- и Mg-АТФ, а также β - и α -АДФ ($p < 0,05$) (табл. 1). Кроме того, при циррозах достоверно чаще, чем в группе контроля, регистрировали пост- γ -АТФ-плато и пост- α -АТФ-плато ($p < 0,01$). Площадь 2,3-ДФГ прямо коррелировала со степенью компенсации цирроза печени ($r = +0,423$, $p < 0,034$). Выявлены прямые корреляции выраженности пиков глюкозо-6-фосфатов, АМФ, пирофосфатов с уровнем непрямого билирубина ($r = +0,378$, $p < 0,012$; $r = +0,401$, $p < 0,027$; $r = +0,318$; $p < 0,042$ соответственно). Установлена отрицательная связь выраженности пиков γ , α и β -АТФ с уровнем сывороточного железа ($r = -0,375$, $p < 0,034$ для γ -АТФ; $r = -0,269$, $p < 0,04$ для α -АТФ; $r = -0,498$, $p < 0,053$ для β -АТФ).

Наблюдаемые в нашей работе снижение уровня три- и дифосфатов и высокий уровень

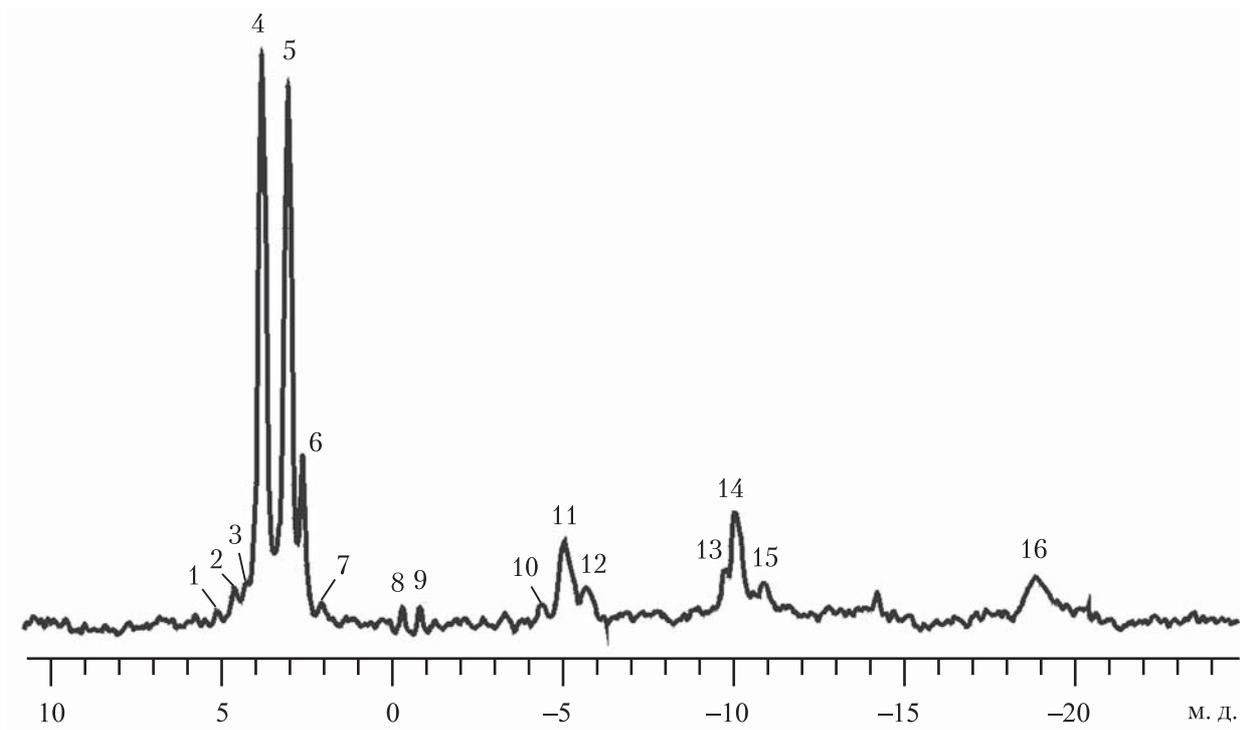


Рис. 1. Типичный ^{31}P ЯМР-спектр взвесей эритроцитов: 202,46 МГц от 10 до -25 м. д. в K^+/Na^+ -буфере, рН 7,36 при 25 °С (внутренний стандарт – 2,3 ДФГ (хим. сдвиги: 3,3 м. д. для 3-Р и 2,6 м. д. для 2-Р))

2,3-дифосфоглицериновой кислоты у больных с циррозами печени, вероятно, отражают значительный уровень гипоксии. Известно, что главная функция 2,3-ДФГ заключается в регуляции сродства гемоглобина к кислороду. Следовательно, оксигенация клеток крови влияет на связывание фосфорных метаболитов с оксигемоглобином и вызывает его полимеризацию. Это может существенно изменить величину химических сдвигов ^{31}P и форму линий сигналов ^{31}P -содержащих метаболитов, особенно 2,3-ДФГ и АТФ. Кислородтранспортная функция эритроцитов зависит не только от количества и свойств содержащегося в них гемоглобина, но и от условий функционирования последнего. Установлено, что 2,3-ДФГ, образуя специфические комплексы с гемоглобином, заметно изменяет сродство гемоглобина к кислороду. При недостатке кислорода в среде концентрация 2,3-ДФГ в эритроцитах возрастает, вследствие чего сродство гемоглобина к кислороду снижается, кривая диссоциации оксигемоглобина смещается вправо. Происходит увеличение поступления кислорода к тканям. Поэтому повышение уровня образования 2,3-ДФГ для облегчения транспорта кислорода имеет, вероятно, адаптационный характер.

Истощение пула АТФ в эритроцитах больных с циррозами приводит к ряду нарушений, в том числе к блокированию ионных насосов и изменению ионного баланса в системе среда – клетка.

Это способствует снижению величины соотношения площади поверхности к объему эритроцитов и превращению клеток в труднодеформируемые сферы (как в нашем исследовании), что затрудняет транспорт кислорода из эритроцита к тканям и усугубляет гипоксию, которая стимулирует фиброобразование.

С другой стороны, прогрессирование фиброза сопровождается активацией перекисного окисления липидов [5], в результате чего существенно снижается уровень восстановленного глутатиона, который расходуется для разложения гидроперекисей липидов и H_2O_2 . S. Rapoport и D. Schleuch (1960) [6] убедительно показали, что снижение уровня восстановленного глутатиона в эритроцитах приводит к инактивации ряда ключевых ферментов (глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, пироглюкофосфатазы, гексокиназы). Это сопровождается увеличением уровня монофосфатов, пирофосфатов и глюкозо-6-фосфата, которые являются субстратами для указанных ферментов. Такую картину наблюдали в группе пациентов с циррозом печени. Подобные изменения в эритроцитах вызывают их преждевременную гибель, то есть лизис клеток с высвобождением гемоглобина и нарастанием уровня непрямого билирубина, чем и объясняются тесные корреляции последнего с содержанием моно-, пиро- и глюкозо-6-фосфатов ($r = +0,512$, $p < 0,02$; $r = +0,474$, $p < 0,03$; $r = +0,61$, $p < 0,05$ соответственно).

Таблиця 1. Характеристики резонансов ^{31}P ЯМР-спектров взвесей эритроцитов ($M \pm m$)

Характеристика резонансов		Больные с циррозом печени (n = 37)	Группа сравнения (n = 33)	p
Количество монофосфатпиков		1,640 ± 0,210	1,190 ± 0,078	< 0,05
1-й пик	Высота, %	7,682 ± 0,678	6,073 ± 0,293	< 0,05
	Ширина, Гц	67,980 ± 1,540	64,900 ± 1,590	> 0,05
2-й пик	Высота, %	24,521 ± 2,181	19,080 ± 2,340	< 0,05
	Ширина, Гц	65,610 ± 2,580	57,690 ± 2,320	< 0,05
3-й пик	Высота, %	10,443 ± 1,031	—	—
	Ширина, Гц	44,780 ± 2,140	—	—
4–5-й пик	Высота 4-го пика, %	99,987 ± 0,278	99,723 ± 0,219	> 0,05
	Высота 5-го пика, %	96,740 ± 0,787	94,550 ± 0,467	< 0,02
	Ширина, Гц	97,890 ± 2,360	86,440 ± 2,800	< 0,01
6-й пик	Высота, %	91,687 ± 0,791	94,642 ± 0,381	< 0,001
	Ширина, Гц	78,410 ± 2,320	75,024 ± 2,590	> 0,05
Количество пиков постнеорганического фосфора		1,230 ± 0,047	1,220 ± 0,082	> 0,05
7-й пик	Высота, %	19,011 ± 0,681	21,408 ± 0,334	< 0,002
	Ширина, Гц	36,170 ± 1,350	40,760 ± 1,210	< 0,01
10-й пик	Высота, %	2,870 ± 0,396	4,815 ± 0,408	< 0,001
	Ширина, Гц	41,240 ± 2,110	43,010 ± 2,050	> 0,05
11-й пик	Высота, %	8,689 ± 0,735	16,325 ± 0,592	< 0,0001
	Ширина, Гц	106,320 ± 3,010	132,390 ± 2,530	< 0,0001
12-й пик	Высота, %	3,074 ± 0,265	4,837 ± 0,232	< 0,0001
	Ширина, Гц	71,320 ± 3,050	96,052 ± 2,630	< 0,0001
Пик плато пост- γ -АТФ	Высота, %	2,112 ± 0,364	—	—
	Ширина, Гц	149,210 ± 2,420	—	—
13-й пик	Высота, %	3,921 ± 0,374	5,684 ± 0,147	< 0,0001
	Ширина, Гц	39,250 ± 3,070	58,150 ± 2,610	< 0,0001
14-й пик	Высота, %	10,157 ± 0,819	20,282 ± 0,781	< 0,0001
	Ширина, Гц	116,350 ± 3,120	149,790 ± 4,780	< 0,0001
15-й пик	Высота, %	3,981 ± 0,147	5,157 ± 0,141	< 0,0001
	Ширина, Гц	62,040 ± 3,070	81,510 ± 5,230	< 0,0001
Высота плато α -АТФ, %		4,342 ± 0,231	5,615 ± 0,255	< 0,001
16-й пик	Высота, %	3,174 ± 0,124	6,021 ± 0,255	< 0,0001
	Ширина, Гц	304,320 ± 4,250	302,170 ± 4,610	> 0,05

В проведенных ранее исследованиях [10, 18] установлена связь степени развития фиброза с повышенным накоплением железа в ткани печени. Ускоренное развитие фиброза в условиях перегрузки железом можно объяснить тем, что при этом происходит активизация процессов перекисного окисления, продукты которого могут оказывать профиброгенное влияние. Высокий уровень железа в сыворотке крови оказывает значительное парамагнитное воздействие и приводит

к существенному снижению, «размыванию» пиков ЯМР-спектров эритроцитов, что нашло отражение в отрицательной корреляции интенсивности пиков трифосфатов (γ , α и β -АТФ) и уровня сывороточного железа. С другой стороны, перегрузка железом усиливает прогрессирование фиброза, что в свою очередь способствует дефициту макроэргических соединений и усугубляет его.

Более частая регистрация сглаженных пиков микроокружения (плато пост- γ -, α -АТФ) на

спектрах эритроцитов у пациентов с циррозами печени, возможно, также является отражением усиления процессов перекисного окисления в клетках, что неизбежно в условиях длительно существующей гипоксии и накопления недоокисленных продуктов обмена. У таких пациентов, как правило, большая длительность и тяжесть течения заболевания, поэтому синтез фракций эритроцитов с подобными измененными свойствами может рассматриваться как адаптивная реакция организма на процесс прогрессирования фиброза.

Одним из важных факторов, определяющих кровоток на уровне микроциркуляторного русла, является способность эритроцитов к деформации, обусловленная жидким характером клеточного содержимого, эластичностью эритроцитарной мембраны и относительным избытком поверхностной площади мембраны по отношению к внутриэритроцитарному объему. Пластичность эритроцитов в значительной степени определяется также уровнем макроэргических соединений в эритроците.

Исследование электрических и вязко-упругих параметров эритроцитов у пациентов с циррозами выявило их низкую способность к деформации под действием НПЭП на фоне высоких обобщенных показателей вязкости и жесткости, малую скорость движения к электродам на всех частотах, отражающую низкий поверхностный отрицательный заряд клеток, сниженные уровни поляризуемости (табл. 2), демонстрирующие снижение функциональной активности клеток при стрессах различной интенсивности. Получены высокодостоверные сильные обратные корреляции жесткости эритроцитов и амплитуды деформации ($r = -0,78$, $p < 0,002$). С другой стороны, амплитуда деформации эритроцитов

прямо коррелировала с уровнями γ , α и β -АТФ ($r = +0,46$, $p < 0,004$ для пика γ -АТФ; $r = +0,494$, $p < 0,002$ для пика α -АТФ; $r = +0,454$, $p < 0,005$ для пика β -АТФ). Поэтому низкий уровень фосфоросодержащих соединений в эритроцитах пациентов с циррозами печени является фактором, усугубляющим низкую деформабельность клеток. Известно, что эритроциты являются одним из мощных источников эндогенного оксида азота в организме [14, 16], однако высвобождение NO из клетки происходит в процессе ее деформируемости. Резкое снижение последней у пациентов с циррозами печени приводит к нарушению вазодилатации и усугубляет гипоксию.

Низкие показатели электрической емкости мембран эритроцитов, отражающие их утолщение, в сочетании с высоким уровнем электропроводности мембран свидетельствуют о значительных изменениях структуры мембран эритроцитов у больных циррозом печени. Из диэлектриков (у здоровых лиц) они становятся хорошими проводниками электрического тока, что приводит к снижению резистентности клеток, следствием чего становится склонность эритроцитов к избыточному гемолизу практически на всех частотах исследуемого диапазона, образованию агрегатов, в том числе смешанных. Одним из факторов развития синдрома внутрисосудистой клеточной агрегации при циррозе печени является снижение отрицательного заряда эритроцитов [3, 6]. Сниженная поляризуемость, отражающая уменьшение физиологической активности эритроцитов, оказалась тесно связанной с индексом деструкции клеток под действием НПЭП ($r = +0,54$, $p < 0,03$). Утолщение мембран эритроцитов при циррозах печени в значительной степени связано с диспротеинемией. Установлены прямые корреляции электрической

Таблица 2. Вязко-упругие и электрические параметры эритроцитов ($M \pm m$)

Параметр	Больные с циррозом печени (n = 37)	Группа сравнения (n = 33)	p
Амплитуда деформации, 10^{-6} м	0,50 \pm 0,18	2,6 \pm 0,11	< 0,0001
Обобщенный показатель жесткости, 10^{-6} Н/м	9,97 \pm 0,98	4,20 \pm 0,63	< 0,0001
Обобщенный показатель вязкости, Па \cdot с	0,76 \pm 0,11	0,32 \pm 0,05	< 0,001
Индекс агрегации эритроцитов, усл. ед.	0,82 \pm 0,19	0,42 \pm 0,01	< 0,05
Индекс деструкции эритроцитов, %	5,67 \pm 1,17	1,09 \pm 0,72	< 0,001
Электропроводность, 10^{-5} см/м	8,95 \pm 0,93	2,91 \pm 0,30	< 0,0001
Емкость клеточной мембраны, 10^{-14} Ф	2,98 \pm 0,60	5,18 \pm 0,22	< 0,001
Скорость движения эритроцитов к электродам, мкм/с	3,94 \pm 3,87	14,70 \pm 2,34	< 0,02
Положение равновесной частоты, 10^5 Гц	8,31 \pm 0,90	4,65 \pm 0,46	< 0,001
Поляризуемость на частоте 1 МГц, 10^{-15} м ³	0,45 \pm 0,33	1,60 \pm 0,42	< 0,05

емкости мембран эритроцитов с уровнем альбуминов ($r = +0,623$, $p < 0,0033$) и обратные — с уровнем γ -глобулинов ($r = -0,514$, $p < 0,001$). Высокий уровень фибриногена также увеличивает толщину мембран эритроцитов, адсорбируясь на них, снижая отрицательный поверхностный заряд клеток посредством его экранирования ($r = -0,487$, $p < 0,002$). Равновесная частота при диэлектрофорезе эритроцитов у пациентов с циррозами оказалась резко сдвинутой в высокочастотный диапазон, отражая выраженность нарушений электрических параметров клеток.

Данные литературы свидетельствуют о тесной зависимости электрических, вязко-упругих характеристик эритроцитов от структуры их мембран [2, 3, 6]. Известно, что основными компонентами мембран эритроцитов в норме являются фосфолипиды и свободный холестерин [2, 6]. В мембранах эритроцитов у больных с циррозами печени выявлено достоверное увеличение относительного содержания холестеринной фракции и снижение уровня общих липидов, фракций общих фосфолипидов, триглицеридов и эфиров холестерина по сравнению с аналогичными показателями у лиц контрольной группы (рис. 2). Установлены прямые корреляции уровня холестеринной фракции в мембранах эритроцитов с обобщенными показателями вязкости ($r = +0,70$, $p < 0,04$), жесткости ($r = +0,42$, $p < 0,032$), электропроводности ($r = +0,62$, $p < 0,024$) и обратные — с амплитудой деформации эритроцитов ($r = -0,67$, $p < 0,015$), поляризуемостью при частоте 10 МГц ($r = -0,58$, $p < 0,05$). Снижение содержания триглицеридов в мембранах эритроцитов у больных с циррозами печени по сравнению с соответствующим показа-

телем у здоровых, возможно, связано с недостаточностью ферментных систем гепатоцитов [5, 7].

Для поддержания стабильного состояния мембран клеток важное значение имеет величина соотношения холестерин/фосфолипиды [10]. Возрастание этого показателя, наблюдаемое у больных с циррозами печени ($2,08 \pm 0,032$) по сравнению с ($1,12 \pm 0,024$) ммоль/моль в контроле), очевидно, приводит к повышению вязкости, нарушению проницаемости липидного бислоя и изменению активности мембраносвязанных ферментов [6, 12, 18]. Установлены прямые достоверные корреляции величины этого соотношения со значениями обобщенной вязкости эритроцитов ($r = +0,437$, $p < 0,02$), жесткости клеток ($r = +0,513$, $p < 0,033$), электропроводности мембран эритроцитов ($r = +0,411$, $p < 0,048$) и обратные — с амплитудой деформации эритроцитов под действием НПЭП ($r = -0,583$, $p < 0,05$).

Исследованиями показано, что в результате встраивания холестерина в мембрану эритроцитов изменяются их размеры и форма, резко снижается фильтрационная способность [8, 12]. Это может привести к затруднению движения эритроцитов по микроциркуляторному руслу и нарушению процессов переноса кислорода, то есть вызвать тканевую ишемию. При циррозах печени изменения эритроцитов приводят к ухудшению микрореологических свойств крови, повреждению эндотелия сосудов эритроцитарными агрегатами [17, 21].

Снижение уровня общих фосфолипидов в мембранах эритроцитов у пациентов с циррозами печени вызвано преимущественно уменьшением содержания легкоокисляемых фракций фосфолипидов (фосфатидилхолин — $15,3 \pm 1,78$) по сравнению с ($22,1 \pm 1,23$) % в контрольной группе, $p < 0,002$, фосфатидилсерин — $8,9 \pm 0,94$) и ($12,2 \pm 0,71$) %, $p < 0,01$, фосфатидилэтаноламин — $12,6 \pm 1,97$) и ($19,4 \pm 1,28$), $p < 0,01$ и сфингомиелина — $7,9 \pm 0,79$) и ($10,2 \pm 0,48$) %, $p < 0,02$). Возможно, одной из причин снижения содержания фракций фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина было усиление их распада в мембранах эритроцитов под действием фосфолипазы A_2 с отщеплением жирных кислот, в частности арахидоновой кислоты [6, 9]. Окислительная деструкция фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина, связанная с большей ненасыщенностью жирнокислотного состава этих фракций, привела к уменьшению активности противорадикальной системы мембран и ряда мембран-ассоциированных ферментов [6, 9, 11, 20].

Увеличение относительного содержания лизофракций фосфолипидов (лизофосфатидилхолин —

Фракция

- Общих фосфолипидов
- Холестериновая
- Триглицеридов
- Эфиров холестерина

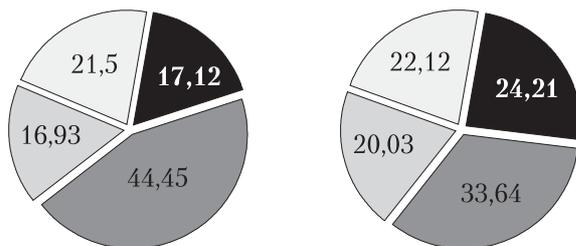


Рис. 2. Состав общих липидов в мембранах эритроцитов, %

($11,64 \pm 0,92$) по сравнению с ($6,97 \pm 0,87$) % в контрольной группе, $p < 0,001$, лизофосфатидилэтанолламин — ($9,53 \pm 0,97$) и ($5,11 \pm 0,67$) %, $p < 0,001$), вероятно, связано с усилением процессов перекисного окисления липидов при циррозах печени [5, 9, 17]. Избыточное накопление лизофракций в мембранах эритроцитов является одной из причин снижения АТФазной активности. Наряду с изменением активности мембраносвязанных ферментов, повышенное содержание лизофосфатидилхолина вызывало деформацию клеток, в том числе эритроцитов [6, 10]. Цитолитический эффект лизофосфолипидов обусловлен сочетанием действия их как поверхностно-активных веществ и ионофоров, вызывающих структурные перестройки липидного компонента и белков в мембранах клеток [6]. Возможно, одной из причин повышения индекса деструкции при циррозах печени было увеличение количества лизофракций фосфолипидов. Установлена прямая корреляция индекса деструкции при 10 МГц с уровнем лизофосфатидилхолина в мембранах эритроцитов ($r = +0,420$, $p < 0,05$). Возрастание содержания в мембранах клеток лизофракций фосфолипидов могло быть связано либо с повышением гидролиза соответствующих фосфолипидов, либо со снижением активности лизофосфолипазы.

Физико-химические свойства мембранных фосфолипидов во многом определяет метабо-

лизм жирных кислот [2, 6, 19]. По данным настоящего исследования, имело место перераспределение относительного содержания основных жирных кислот (пальмитиновая, стеариновая, олеиновая, линолевая, арахидоновая) во фракциях фосфолипидов мембран эритроцитов у больных с циррозами печени по сравнению с контролем. Наблюдали достоверное увеличение относительного содержания насыщенных жирных кислот при снижении относительного содержания ненасыщенных (преимущественно полиненасыщенных жирных кислот — докозотетраеновой, докозгексаеновой) (рис. 3).

Снижение содержания арахидоновой кислоты у больных с циррозами печени (более чем в 2,7 раза по сравнению с контролем), вероятно, происходит за счет повышенного потребления арахидоната печенью для синтеза простагландинов.

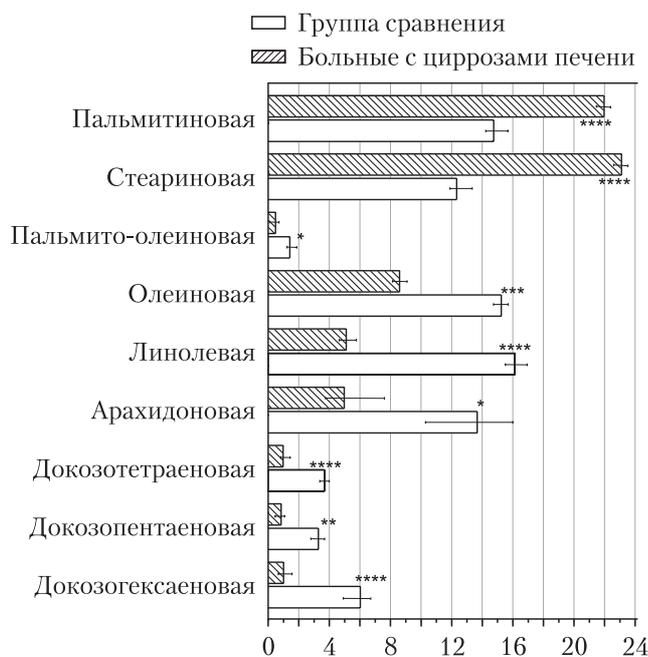
Кроме того, при циррозах печени во фракциях фосфолипидов мембран эритроцитов достоверно повышена величина отношения суммы насыщенных кислот к сумме ненасыщенных и особенно — к сумме полиненасыщенных жирных кислот по сравнению с соответствующими показателями здоровых людей (табл. 3). Результаты последних исследований [13] показали, что процентное содержание полиненасыщенных жирных кислот (эйкозапентаеновой и докозгексаеновой) от общего содержания жирных кислот в мембранах эритроцитов является независимым фактором риска внезапной коронарной смерти. Это связано с влиянием эйкозаноидной системы на вазодилатацию, воспаление, снижение уровня триглицеридов в крови, проаритмические эффекты, уменьшение уровня проатерогенных цитокинов и факторов роста [13]. Поэтому снижение ω -3-индекса у пациентов с циррозами печени является возможным предиктором осложнений, связанных с системной вазодилатацией, развитием цирротической кардиомиопатии.

Уровень полиненасыщенных жирных кислот при циррозах печени обратно пропорционально коррелировал с величинами обобщенных показателей вязкости ($r = -0,492$, $p < 0,033$), жесткости ($r = -0,532$, $p < 0,02$), электропроводности мембран ($r = -0,439$, $p < 0,041$) и прямо пропорционально — с амплитудой деформации клеток под действием НПЭП ($r = +0,468$, $p < 0,048$).

Выводы

У больных с циррозами печени по сравнению с контролем:

- увеличено содержание деформированных форм эритроцитов;
- в эритроцитах повышена интенсивность резонансов глюкозо-6-фосфатов, АМФ, ИМФ, пи-



Различия между группами статистически значимы:
* $p < 0,05$; ** $p < 0,02$; *** $p < 0,01$; **** $p < 0,001$.

Рис. 3. Содержание жирных кислот во фракциях фосфолипидов в мембранах, %

Таблиця 3. Показатели жирнокислотного спектра фракций фосфолипидов мембран эритроцитов ($M \pm m$)

Параметр	Больные с циррозом печени (n = 37)	Группа сравнения (n = 33)	P
Арахидоновая кислота/линолевая кислота	0,97 ± 0,19	0,84 ± 0,17	> 0,05
Насыщенные жирные кислоты, %	78,02 ± 2,82	63,15 ± 1,71	< 0,001
Ненасыщенные жирные кислоты, %	21,98 ± 2,88	36,85 ± 2,17	< 0,001
Полиненасыщенные жирные кислоты, %	7,8 ± 1,57	13,93 ± 2,21	< 0,05
Насыщенные жирные кислоты/ненасыщенные жирные кислоты	3,55 ± 0,31	1,87 ± 0,29	< 0,001
Насыщенные жирные кислоты/полиненасыщенные жирные кислоты	10,04 ± 1,57	4,67 ± 0,45	< 0,001

рофосфатов, 2,3-ДФГ и снижены пики, представляющие резонансы неорганических фосфатов, фосфокреатина, γ -, α -, β -АТФ, γ -, α -, β -УТФ, Нв- и Mg-АТФ, β - и α -АДФ;

- обобщенные показатели жесткости, вязкости, электрическая проводимость мембраны, индексы агрегации, деструкции эритроцитов увеличены, а амплитуда деформации клеток, поляризуемость, емкость мембран, скорость движения клеток к электродам уменьшены;

- липидный и жирнокислотный состав мембран эритроцитов характеризуется увеличением относительного содержания холестериновой фракции, насыщенных жирных кислот и более низким уровнем общих липидов и фосфолипидов, триглицеридов, эфиров холестерина и ненасыщенных жирных кислот (особенно полиненасыщенных — докозотетраеновой, докозогексаеновой).

- величина соотношения холестерин/фосфолипиды в мембранах эритроцитов повышена за счет снижения уровня общих фосфолипидов (фракций фосфатидилхолина, фосфатидилсерина, фосфатидилэтаноламина и сфингомиелина) при увеличении относительного содержания лизофракций фосфолипидов.

Установленные корреляции электрических и вязко-упругих характеристик эритроцитов с уровнями структурных компонентов их мембран и макроэргических соединений позволяют

рекомендовать ДЭФ в НПЭП как малозатратный, легковыполнимый метод с высокой пропускной способностью для косвенной оценки нарушений липидного (фосфолипидного, жирнокислотного) состава мембран эритроцитов и степени внутриклеточного энергодефицита, что при прямом измерении весьма трудоёмко.

Результаты настоящего исследования свидетельствуют о наличии на фоне цирроза печени резких изменений структурно-функциональных параметров эритроцитов и уровня фосфорорганических метаболитов. С этой точки зрения эритроциты являются «свидетелями» наличия выраженного фиброза печени. С другой стороны, изменения параметров эритроцитов (наиболее многочисленных клеток крови), приводящие к микроциркуляторным нарушениям, в том числе в печени, сами по себе становятся мощным фактором фиброгенеза. С этой точки зрения эритроциты могут быть «виновниками» развития и прогрессирования фиброза.

В любом случае ДЭФ эритроцитов в НПЭП представляется весьма перспективным методом для оценки эффективности тех или иных методов лечения и прогноза цирроза печени.

Исследование выполнено при поддержке Министрства образования и науки Российской Федерации, соглашение № 8041 от 24 августа 2012 г., номер заявки 2012-1.1.-12.000-1001-004.

Список литературы

1. Гастроэнтерология. Национальное руководство / Под ред. В.Т. Ивашкина, Т.Л. Лапиной.— М.: Гэотар-Медиа, 2008.— 700 с.
2. Геннис Р. Биомембраны: Молекулярная структура и функции.— М.: Мир, 1997.— 624 с.
3. Исследование системы крови в клинической практике /

Под ред. Г.И. Козинца, В.А. Макарова.— М.: Триада-Х, 1997.— 480 с.

4. Кейтс М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов.— М.: Мир, 1975.— 513 с.
5. Маевская М.В. Патогенез алкогольной болезни печени и роль генетической предрасположенности в ее развитии // Клин. перспективы гастроэнтерол., гепатол.— 2004.— Т. 5.— С. 2—11.

6. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степоява Е.А. Физиология и патофизиология эритроцита.— Томск: Изд-во ТГУ, 2004.— 202 с.
7. Подымова С.Д. Болезни печени.— М.: Медицина, 1993.— 544 с.
8. Сторожок С.А., Панченко Л.Ф., Филиппович Ю.Д., Глушков В.С. Изменения физико-химических свойств биологических мембран при развитии толерантности к этанолу // *Вопр. мед. химии.*— 2001.— № 2.— С. 42—51.
9. Bouneva I., Abou-Assi S., Heuman D.M., Mihas A.A. Alcoholic liver disease // *Hosp. Physician.*— 2003.— Vol. 12, N 10.— P. 31—38.
10. Delaunay J. Molecular basis of red cell membrane disorders // *Acta Haematol.*— 2002.— Vol. 108, N 4.— P. 210—218.
11. Delpero C., Gastaqldi M., Verine A. et al. Structural characteristic of erythrocyte in alcoholic patients // *Alcohol. Clin. Exp. Res.*— 1986.— Vol. 10, N 6.— P. 602—605.
12. Hanss M., Koutsouris D. The role of lipids in erythrocyte rheology // *Colloid and Surfaces.*— 1985.— Vol. 14, N 3—4.— P. 261—268.
13. Harris W.S. Extending the cardiovascular benefits of omega-3 fatty acids // *Curr. Atheroscler. Rep.*— 2005.— N 7.— P. 375—380.
14. Kazushi Tsuda, Keizo Kimura, Ichiro Nishio, Yoshiaki Masuyama Nitric oxide improves membrane fluidity of erythrocytes in essential hypertension: an electron paramagnetic resonance investigation // *Biochemical and Biophysical Research Communications.*— 2000.— Vol. 275.— P. 946—954.
15. Kuntz E., Kuntz H.D. *Hepatology principles and practice.*— Berlin; Heidelberg: Springer Verlag, 2002.— P. 469—488.
16. Kuwai T., Hayashi J. Nitric oxide pathway activation and impaired red blood cell deformability with hypercholesterolemia // *J. Atheroscler Thrombosis.*— 2007.— Vol. 13, N 6.— P. 286—294.
17. Menon K.V.N., Gores J., Shah V.H. Pathogenesis, diagnosis, and treatment of alcoholic liver disease // *Mayo Clin. Proc.*— 2001.— Vol. 76.— P. 1021—1029.
18. Ohvo-Rekila H., Ramstedt B., Leppimaki P., Slotte J.P. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes // *Prog. Lipid Res.*— 2002.— Vol. 41, N 1.— P. 457—468.
19. 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.— Vol. 20, N 1.— P. 56A—59A.
20. Signorini-Aliberti N., Gonthier B., Lamarche F. et al. Chronic consumption of ethanol leads to substantial cell damage in cultured rat astrocytes in conditions promoting acetaldehyde accumulation // *Alcohol and Alcoholism.*— 2005.— Vol. 40, N 3.— P. 163—171.
21. Walsh K., Graeme A. Alcoholic liver disease // *Postgrad. Med. J.*— 2000.— Vol. 76.— P. 280—286.

С.А. Курилович, М.В. Кручинина, А.О. Громов, В.М. Генералов,
Т.С. Бакіров, В.О. Ріхтер, Д.В. Семенов, М.М. Шакиров, С.В. Морозов

Особливості параметрів еритроцитів при цирозах печінки: еритроцити — «свідки» чи «винуватці» прогресування фіброзу печінки?

Вивчено електричні і в'язкопружні параметри еритроцитів та фосфоліпідів у пацієнтів із цирозом печінки. Встановлено в еритроцитах підвищену інтенсивність резонансів глюкозо-6-фосфатів, АМФ, ІМФ, пірофосфатів, 2,3-ДФГ і знижені піки, які представляють резонанси неорганічних фосфату, фосфокреатину, γ -, α -, β -АТФ, γ -, α -, β -УТФ, Нв- і Mg-АТФ, β - і α -АДФ. Дослідження електричних і в'язкопружних параметрів еритроцитів виявило, що узагальнені показники жорсткості, в'язкості, електрична провідність, індекси агрегації, деструкції еритроцитів підвищені, а амплітуда деформації клітин, поляризованість, місткість, швидкість руху клітин до електродів зменшені. Ліпідний і жирнокислотний склад мембран еритроцитів характеризувався збільшенням відносного змісту фракції холестерину, насичених жирних кислот і нижчим рівнем загальних ліпідів і фосфоліпідів, тригліцеридів, ефірів холестерину та ненасичених жирних кислот (особливо поліненасичених — докозотетраєнової, докозогексаєнової).

Отримані дані свідчать про виражені зміни структурно-функціональних характеристик еритроцитів на тлі цирозу печінки. Водночас посилення порушень параметрів клітин червоної крові спричиняє мікроциркуляторні порушення, зокрема в печінці, що саме по собі стає потужним чинником фіброгенезу.

S.A. Kurilovich, M.V. Kruchinina, A.A. Gromov, V.M. Generalov,
T.S. Bakirov, V.A. Rihter, D.V. Semenov, M.M. Shakirov, S.V. Morozov

The peculiarities of the RBC parameters at liver cirrhosis: are RBCs the «witnesses» or the «originators» of the liver fibrosis progression?

The study has been held of the electric and viscoelastic parameters of RBCs and phospholipids in patients with liver cirrhosis. It has been established that RBCs had the raised intensity of the resonances of glucose-6-phosphates, AMP, IMP, pyrophosphates, 2,3-DPG and the reduced picks that present the resonances of non-organic phosphates, phosphocreatine, γ -, α -, β -ATP, γ -, α -, β -UTP, Нв- and Mg-ATP, β - and α -ADP. The investigation of the electric and viscoelastic parameters of RBCs revealed, that the summarized indicators of stiffness, viscosity, elec-

tric conductivity, aggregation indices, and RBC destruction were raised, and the amplitude of the cellular deformation, polarization, cellar capacity and speed of the movement to electrodes were decreased. The lipid and fatty acid RBC membranes' composition was characterized with the increased relative levels of cholesterol and saturated fatty acids and the lower levels of total lipids and phospholipids, triglycerides, cholesterol esters and non-saturated fatty acids (particularly of the poly-unsaturated, docosatetraenoic and docosatetraenoic acids).

The obtained data testified about the pronounced changes in the structural and functional RBC characteristics against the cirrhosis background. From the other hand, the enhancement if the disorders in parameters of the red blood cells result in the disturbance of microcirculation, particularly in the liver, which per se becomes the potent fibrosis factor.

Контактна інформація

Курилович Світлана Арсентівна, д. мед. н., проф., зав. лабораторії
630089, м. Новосибірськ, вул. Б. Богаткова, 175/1
Тел. +7 (383) 229-20-58. E-mail: kuilovich@yandex.ru

Стаття надійшла до редакції 13 січня 2013 р.