

М.И. Воевода¹, М.В. Кручинина^{1*}, С.Е. Пельтек², С.А. Курилович¹,
В.Н. Кручинин³, Е.В. Спесивцев³, С.В. Рыхлицкий³, В.А. Володин^{3,6},
В.М. Генералов⁴, В.В. Герасимов^{5,6}, Б.А. Князев^{5,6}

УДК 616.36-076

¹ ФГБУ Научно-исследовательский институт терапии СО РАМН, лаборатория гастроэнтерологии, г. Новосибирск

² Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск

³ Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова СО РАН, лаборатория эллипсомерии, г. Новосибирск

⁴ ФГУН ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», лаборатория биофизического анализа, п. Кольцово, Новосибирская область

⁵ Институт ядерной физики им. Г.И. Будкера СО РАН, г. Новосибирск

⁶ Новосибирский государственный университет, лаборатория прикладной электродинамики

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОПТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ КРОВИ В ДИАГНОСТИКЕ СТАДИИ ЗАБОЛЕВАНИЯ ПРИ ДИФФУЗНОЙ ПАТОЛОГИИ ПЕЧЕНИ

Резюме

Проведена оценка возможности оптических методов исследования эритроцитов и сыворотки крови у пациентов с диффузной патологией печени (ДПП) с различной степенью фиброза для использования в ранней диагностике. Показано, что использование совокупности оптических методов исследования позволяет существенно повысить показатели чувствительности, специфичности, индекс точности, а также достичь реальных результатов в диагностике выраженных стадий фиброза и получить возможность выявлять легкий невыраженный фиброз печени. Выявленные возможности оптических методов могут оказаться перспективными в скрининговом неинвазивном определении стадий заболевания при ДПП различного генеза.

Ключевые слова: диффузная патология печени, фиброз, диагностика, оптические методы исследования крови, скрининг.

Abstract

An assessment of the possibility of optical methods for studying red blood cells and serum of patients with diffuse liver disease with varying degrees of fibrosis for use in early diagnosis has been made. It is shown that the use of combined optical methods can significantly improve the performance of sensitivity, specificity, accuracy index and achieve real results in the diagnosis of both pronounced fibrosis and slight ulterior liver fibrosis. Identified opportunities of optical methods may be promising in screening non-invasive staging in diffuse liver disease of various origins.

Key words: diffuse liver diseases, fibrosis, diagnostics, optical methods for studying blood, screening.

Одним из основных вопросов при верификации диагноза пациента с ДПП является определение стадии заболевания и степени выраженности фиброза печени, поскольку именно это определяет прогноз и дальнейшую тактику терапии. По-прежнему актуальным остается вопрос диагностики ранних степеней фиброза, т.к. эти стадии заболеваний печени обратимы [2]. Предложено много методов определения степени фиброза печени (биохимический, макроморфологический, полуколичественный и др.) [2, 12], которые наряду с очевидными преимуществами зачастую имеют ряд существенных недостатков: сложная пробоподготовка, высокая стоимость реактивов, оборудования, недостаточная чувствительность, специфичность. «Золотым стандартом» диагностики выраженности фиброза остается биопсия печени, хотя и в этом случае возникают

проблемы субъективизма при получении результатов исследования, необходимость изучения ряда биоптатов, часто — противодействие со стороны пациентов.

Оптические методы исследования форменных элементов и сыворотки крови обладают рядом достоинств, важных для исследования биологических объектов. Это прежде всего высокая чувствительность как при измерении низких концентраций биоорганических соединений в растворах, так и при нанесении этих растворов на твердые подложки. Во-вторых, это неразрушающий характер воздействия на биообъекты, многие из которых обладают сложной структурой. В-третьих, высокая оперативность измерений, которые не требуют создания особых условий (высокого вакуума, нагрева или охлаждения исследуемого образ-

ца, специальных ионизирующих излучений, использования флуоресцентных меток).

Данные предшествующих исследований электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов, эллипсометрических показателей сыворотки крови у пациентов с ДПП позволили получить pilotные результаты, обнадеживающие в отношении определения стадии заболевания [1, 7].

Цель данной работы — оценить возможность применения оптических методов исследования эритроцитов и сыворотки крови у пациентов с ДПП с различной степенью фиброза для использования в ранней диагностике.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследованы 62 мужчины в возрасте от 38 до 69 лет с ДПП, подписавшие информированное согласие на участие в исследовании. Группу сравнения составили 21 человек в возрасте от 35 до 60 лет, у которых по данным биохимических и инструментальных методов исследования не было выявлено клинически манифестирующих хронических заболеваний внутренних органов, а оцениваемые биохимические и гематологические показатели крови были в нормальных пределах.

Степень выраженности фиброза устанавливалась на основании данных биопсии, которая была проведена 21 пациенту с диффузными заболеваниями печени. У 41 пациента степень фиброза печени определялась макроморфологическими методами визуализации (ультразвуковое исследование (УЗИ), компьютерная томография (КТ), ядерно-магнитно-резонансная томография (ЯМРТ)). В группе сравнения биопсия печени не проводилась по этическим соображениям. Всем обследованным выполнены биохимические и инструментальные исследования, УЗИ печени, селезенки, а также портальных сосудов. Вирусная этиология заболевания устанавливалась на основании обнаружения серологических маркеров методом иммуноферментного анализа (ИФА) и/или ДНК и РНК вирусов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), а алкогольная — при отрицательных результатах ИФА сывороточных маркеров вирусных гепатитов и достоверно подтвержденном систематическом потреблении алкоголя.

При анализе данных биопсии печени оценивались отдельно гистологический индекс активности хронического вирусного гепатита и степень выраженности фиброза печени. Большинство больных (14 человек) имело умеренную степень гистологической активности (от 9 до 12 баллов); у 5 мужчин гистологическая активность оказалась легкой (от 4 до 8 баллов) и у 2 была выраженной (от 13 до 18 баллов).

По результатам совокупного анализа сформированы 3 группы по степени выраженности фиброза печени. 1-я — группа сравнения (21 человек) без признаков

фиброза печени (F0). 2-я группа включала 39 пациентов с 1-й или 2-й степенью фиброза (легкий невыраженный фиброз — F1-F2). В 3-ю группу входили 23 пациента с 3-й или 4-й степенью фиброза (выраженный фиброз — F3-F4).

В группе пациентов со степенью фиброза F1-F2 выявлено наличие хронических вирусных гепатитов (у 9 — С, у 15 — В, у 4 — В+С генеза) с минимальной (у 16 пациентов) и умеренной (у 12 больных) биохимической активностью. 12 пациентов этой группы систематически потребляли алкоголь, т.е. имели смешанную (вирусно-алкогольную) этиологию процесса. У 11 больных генез патологии печени был расценен как алкогольный, маркеры вирусной инфекции у них не были выявлены. Гистологическая активность процесса в этой группе соответствовала степени фиброза, т.к. была от 4 до 8 баллов (A1).

В группе пациентов со степенью фиброза F3-F4 у 9 человек верифицирован хронический вирусный гепатит С, у 14 — хронический вирусный гепатит В. При этом у 10 из 23 мужчин хроническая вирусная инфекция протекала на фоне длительного злоупотребления алкоголем. Биохимическая активность гепатитов была умеренной. У большей части пациентов с циррозами печени (т.е. гепатитом 4-й стадии) степень компенсации по Чайлд–Пью соответствовала 8–10 баллам (класс В), у 3 человек — 12–14 баллам (класс С). По данным биопсии, большинство больных (11 человек) имели умеренную степень гистологической активности (от 9 до 12 баллов — A2); у 3 она была выраженной (от 13 до 18 баллов — A3).

Обследование выполнено с одобрения Комитета биоэтической этики НИИ терапии СО РАМН. Все обследуемые заполняли стандартные анкеты: 1) информированное согласие пациента на участие в исследовании; 2) стандартная анкета о потреблении алкоголя.

У больных с верифицированным диагнозом, а также у мужчин группы сравнения исследовали электрические, вязкоупругие параметры эритроцитов методом диэлектрофореза (ДЭФ) в неоднородном переменном электрическом поле (НПЭП) с помощью автоматизированной специализированной установки, использующей электрооптическую систему детекции клеток [3]. 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, величины индуцированного дипольного момента и заряда.

Приготовление тонких пленок из сыворотки крови

Для получения тонких пленок из сыворотки крови в настоящей работе использовался метод центрифуги-

* Контакты. E-mail: kruchmargo@yandex.ru. Телефон: (383) 267-97-55

гирования [18, 22]. Подробно получение и оценка качества пленок описаны в работе [1]. Образцы сыворотки крови (~0,1 мл) наносились на центральную часть предварительно отмытых в перекисно-аммиачном травителе кремниевых пластин Si(111) КДБ-10 диаметром 76 мм при комнатной температуре. Скорость вращения составляла 2500 об./мин, время вращения — 10 сек. Перед проведением эллипсометрических измерений пленки в течение 2 ч сушились при комнатной температуре на воздухе. Всем обследуемым были проведены эллипсометрические исследования сыворотки крови методом спектральной и отображающей эллипсометрии.

Эллипсометрическое исследование пленок из сыворотки крови

Эллипсометрические спектры $\Psi(\lambda)$ и $\Delta(\lambda)$ измерялись с помощью спектрального эллипсометрического комплекса «ЭЛЛИПС-1771» (ИФП СО РАН) [6] в диапазоне длин волн $\lambda = 250-1000$ нм, спектральное разрешение прибора составляло 2 нм, время записи одного спектра не превышало 20 сек, угол падения луча света на образец составлял 70°. Использовалась четырехзонная методика измерений с последующим усреднением по всем четырем зонам. Расчет дисперсионных зависимостей показателя преломления $n(\lambda)$ и значений толщины пленок проводился решением обратной задачи эллипсометрии с использованием оптической модели: подложка — пленка — среда. Оценивались следующие экспериментальные характеристики пленок: значения эффективной толщины (δ) и дисперсия показателя преломления $n(\lambda)$ [4].

Для исследования однородности покрытия пластины с имеющимися на поверхности пленками из сыворотки крови были измерены на сканирующем эллипсометре высокого разрешения «Микроскан» (ИФП СО РАН). Считывание эллипсометрических углов Ψ и Δ осуществлялось на центральных областях пластин (диаметр 76 мм) с размерами 15 x 15 мм² с шагом по осям «x» и «y» 0,1 мм. Угол падения луча света на образец составлял 60°.

ИК-Фурье спектроскопия

Запись инфракрасных (ИК) спектров проводилась на ИК-Фурье-спектрометре Bruker Vector 22 в диапазоне длин волн 400–7000 см⁻¹ с разрешением 2 см⁻¹. Для удаления колебаний, связанных с многолучевой интерференцией, и линий поглощения паров воды и углекислого газа использовалась программа OPUS 6.0.

Спектроскопия комбинационного рассеяния света (Raman spectroscopy — Рамановская спектроскопия).

Спектры комбинационного рассеяния света жидких сывороток крови пациентов записывались с по-

мощью спектрометра с тройным монохроматором T64000 (Horiba Jobin Yvon) при комнатной температуре. Для возбуждения использовалась линия Ar⁺ лазера с длиной волны 514,5 нм, спектральное разрешение составляло 1,5 см⁻¹. В качестве детектора использовалась кремниевая матрица фотоприемников, охлаждаемая жидким азотом. Применялась приставка для микроскопических исследований комбинационного рассеяния света. Мощность лазерного пучка, доходящего до образца, составляла 2–3 мВт (размер пятна 5–6 мкм). Для компьютерной обработки данных использовался пакет оригинальных программ Cellfind.

Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка данных выполнена с использованием программы SPSS, ver.10. Достоверность различия показателей оценивали по критериям Стьюдента, Пирсона (при нормальном распределении), в случаях отклонения распределения от нормального использовались непараметрические критерии (U-критерий Манна-Уитни, Колмогорова-Смирнова).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование параметров эритроцитов с помощью электрооптической системы детекции клеток выявило, что эритроциты здоровых лиц на высоких частотах (5x10⁵ Гц и 10⁶ Гц) с высокой поступательной скоростью двигались в сторону ближайшего электрода (положительный диэлектрофорез) и обнаружили ярко выраженную способность к деформации под действием неоднородного переменного электрического поля (НПЭП). На низких частотах (5x10⁴ Гц, 10⁵ Гц) деформации клеток не наблюдалось, эритроциты отталкивались от электродов (отрицательный диэлектрофорез), единичные клетки под действием поля разрушались.

У больных с ДПП взаимодействие эритроцитов с НПЭП достоверно отличалось: амплитуда деформации (на фоне повышенных обобщенных показателей вязкости и жесткости), величина дипольного момента, скорость поступательного движения клеток относительно электродов на высоких частотах были достоверно ниже, чем в контроле ($p < 0,001-0,03$). Избыточный гемолиз клеток наблюдался на всех частотах изучаемого диапазона (5x10⁴ – 10⁶ Гц), сочетаясь с повышенной способностью эритроцитов к образованию агрегатов крупных и средних размеров после перевода эритроцитов в раствор 0,3М сахарозы ($p < 0,001$) (рис. 1).

По мере нарастания степени фиброза (от умеренной степени F1-F2 к тяжелой F3-F4) у пациентов с ДПП эритроциты становились более жесткими, с меньшей способностью к деформации, склонными к об-

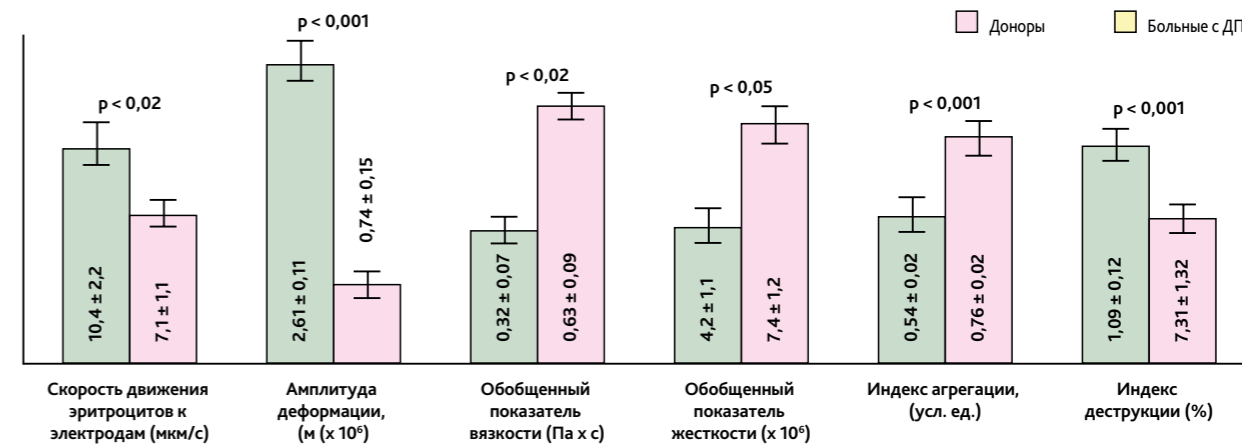


Рисунок 1. Электрические и вязкоупругие параметры эритроцитов у пациентов с диффузной патологией печени и в группе сравнения

разованию агрегатов, обладали низкой резистентностью к воздействию стрессовых факторов различной интенсивности, а поэтому легко разрушались как на низких, так и на высоких частотах при действии НПЭП. Сниженная биологическая активность клеток красной крови коррелировала с пониженным уровнем поляризуемости клеток на всех частотах ($r = 0,57$; $p < 0,02$). Мембраны эритроцитов становились утолщенными (что отражало достоверное снижение уровня электрической емкости — $p < 0,03$), хорошо проводящими электрический ток (т.е. с высокой электропроводностью), хотя в норме оболочки клеток красной крови являются диэлектриками.

Сниженный поверхностный отрицательный заряд эритроцитов при тяжелом фиброзе F3-F4 отражался достоверно более низкими показателями скорости движения клеток к электродам и дипольного момента ($p < 0,01-0,05$) (табл. 1).

Таким образом, было установлено, что наличие ДПП приводит к деполаризации эритроцитов, при этом амплитудно-частотные характеристики клетки в НПЭП являются хорошим индикатором физико-химических свойств ее мембраны и цитоплазмы, а также отражают состояние ее биологической активности.

Таблица 1. Вязкоупругие и электрические характеристики эритроцитов у больных с ДПП с разной степенью фиброза (M ± m)

Показатели	1-я группа, стадия фиброза F0, n = 21	2-я группа, стадия фиброза F1-F2, n = 39	3-я группа, стадия фиброза F3-F4, n = 23
Амплитуда деформации эритроцитов (м)	(2,75 ± 0,53)×10 ⁻⁶	(0,92 ± 0,28)×10 ^{-6**}	(0,61 ± 0,05)×10 ^{-6****}
Обобщенный показатель жесткости (Н/м)	(4,05 ± 0,79)×10 ⁻⁶	(7,4 ± 1,5)×10 ^{-6*}	(12,1 ± 1,4)×10 ^{-6****}
Обобщенный показатель вязкости (Па · с)	0,34 ± 0,07	0,67 ± 0,14*	0,91 ± 0,13****
Индекс агрегации (усл. ед.)	0,54 ± 0,05	0,72 ± 0,04**	0,82 ± 0,04****
Индекс деструкции (%)	1,12 ± 0,15	6,1 ± 1,5**	8,4 ± 2,3**
Поляризуемость (м ³) (частота 10 ⁶ Гц)	(9,78 ± 0,27)×10 ⁻¹⁵	(6,43 ± 0,97)×10 ^{-15***}	(4,90 ± 0,87)×10 ^{-15****}
Электропроводность (см/м)	(2,89 ± 0,42)×10 ⁻⁵	(6,33 ± 0,55)×10 ^{-5**}	(8,53 ± 0,49)×10 ^{-5****}
Емкость клеточной мембраны (Ф)	(6,97 ± 0,46)×10 ⁻¹⁴	(5,07 ± 0,37)×10 ^{-14**}	(3,2 ± 0,41)×10 ^{-14****}
Скорость движения к электродам (мкм/с)	10,4 ± 2,5	6,9 ± 2,1	4,9 ± 2,0*
Равновесная частота (Гц)	(4,96 ± 0,47)×10 ⁵	(6,94 ± 0,49)×10 ^{5**}	(9,5 ± 0,7)×10 ^{5****}
Дипольный момент (Кл·м)	(14,2 ± 3,7)×10 ⁻²²	(6,4 ± 1,7)×10 ^{-22*}	(3,8 ± 1,0)×10 ^{-22**}

Примечание. Величина дипольного момента рассчитывалась при напряженности электрического поля 8,85x10⁻¹² Ф/м.
* — статистическая значимость (p) отличия от 1-й группы (* — p < 0,05, ** — p < 0,02, *** — p < 0,0001).
^ — статистическая значимость (p) отличия от 2-й группы (^ — p < 0,05, ^^ — p < 0,02, **** — p < 0,0001).

Обобщенный анализ данных исследования вязкоупругих и электрических характеристик эритроцитов методом диэлектрофореза по сравнению с данными биопсии для диагностики различных стадий фиброза печени продемонстрировал чувствительность метода 71,4% и специфичность 60%.

Особое внимание обращает на себя значение прогностической ценности положительного результата метода, т.е. выявление случаев со степенью фиброза F3-F4 — 83,3% и индекс точности, равный 68,4%. Однако прогностическая ценность отрицательного результата метода, направленная на выявление отсутствия фиброза, а потенциально и его ранних стадий, оказалась невелика — 42,9%. Потребность в повышении уровня специфичности, чувствительности для установления степени фиброза печени определила необходимость использования оптических методов, в частности, эллипсометрии, ИК-спектроскопии и Raman-спектроскопии сыворотки крови тех же пациентов.

По мере утяжеления стадии заболеваний печени в сыворотке крови происходят все более выраженные сдвиги, связанные с нарушением ее белок-синтетической функции, нарастанием синдромов цитолиза, холестаза, иммунонасоспалительного процесса. Подобные сдвиги не могут не сказаться на

оптических свойствах сыворотки крови, что и было показано в пилотных исследованиях, проведенных нами ранее [1].

Исследование эллипсометрических показателей тонких пленок, полученных из сывороток крови пациентов с разной степенью фиброза печени, позволило установить факт достоверного увеличения показателя преломления в сочетании со снижением толщины пленки по мере нарастания фиброза ($p < 0,001-0,002$) (рис. 2).

Подобные изменения могут быть связаны со снижением синтеза целого ряда соединений в печени (в том числе белков сыворотки крови, факторов свертывания, холестерина, триглицеридов и др.) при выраженном фиброзе, которые являются определяющими для толщины пленки (корреляции для уровня общего холестерина $r = 0,56$, $p < 0,004$; триглицеридов $r = 0,44$, $p < 0,04$; общего белка $r = 0,57$, $p < 0,02$). Преобладание неравномерных пленок при выраженном фиброзе, очевидно, связано с выраженностью биохимического дисбаланса в сыворотке крови при циррозе печени. Показатель преломления определяется в большей степени компонентами синдромов цитолиза (для АЛТ $r = 0,46$, $p < 0,03$, для АСТ $r = 0,41$, $p < 0,05$) и холестаза (для общего билирубина $r = 0,52$, $p < 0,01$, для ГГТП $r = 0,48$, $p < 0,033$), степень выраженности которых повышается при выраженном фиброзе [12].

Исследование однородности поверхности пленок из сывороток крови с помощью сканирующего эллипсометра высокого разрешения «Микроскан» показало, что пленки больного с фиброзом печени F3-F4 очень неравномерны по толщине, имеют большие разрывы по сравнению с таковыми у пациентов с F1-F2 ($p < 0,05$) (рис. 3).

Подобные изменения определялись существенными сдвигами на ИК-спектрах, где регистрируются площадь и интенсивность пиков, определяющих вторичную структуру белков. Особое внимание уделялось анализу амидных групп Amide I, Amide II, Amide III, которые связаны с поглощением ИК-излучения фрагментами O=C-N-H, чувствительными к вторичной структуре белковых молекул (a-helix, b-sheet, random coil). В свою очередь изменение вторичной структуры белковых молекул определяется наличием патологических процессов в орга-

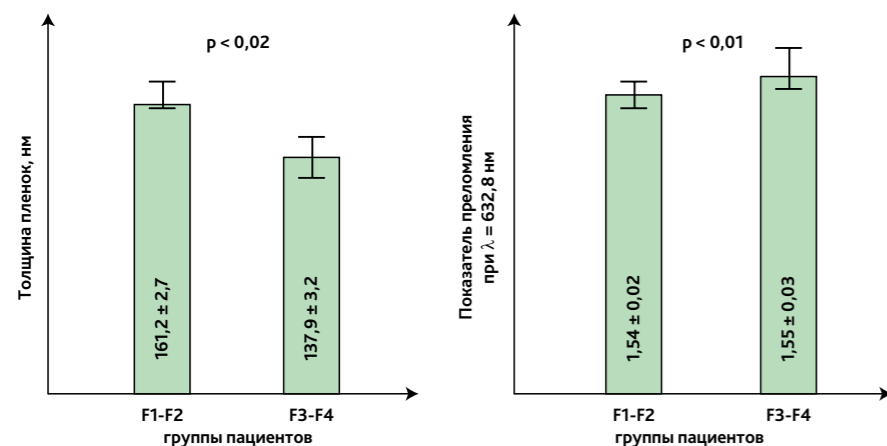


Рисунок 2. Эллипсометрические показатели у пациентов с различной степенью фиброза печени

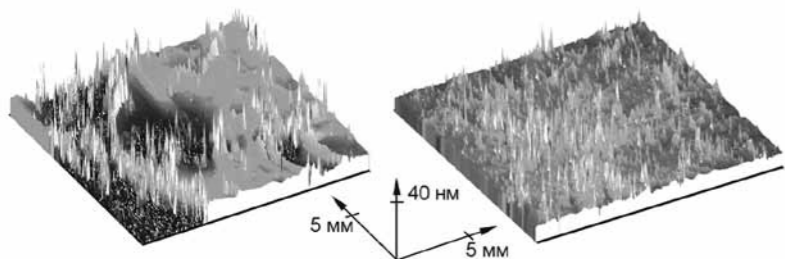


Рисунок 3. Трехмерный вид толщины тонких пленок, приготовленных из сывороток крови пациента с тяжелым фиброзом печени F3-F4 (а) и легким фиброзом печени F1-F2 (б) по поверхности пластин

низме, в том числе и при ДПП при различной степени фиброза.

В ИК-спектрах у пациентов с выраженным фиброзом печени F3-F4 достоверно выше, чем в группе пациентов с F1-F2, оказались пики амид III — при 1280 см⁻¹ в диапазоне спектра основных амидных полос поглощения и пик при 3190 см⁻¹, отражающий N-H структуры, а также достоверно чаще наличие белковых молекул со вторичной структурой в виде спирали (α-helix) ($p < 0,004-0,05$) (рис. 4).

Напротив, у пациентов со степенью фиброза F3-F4 достоверно ниже, чем в группе F1-F2, были пики при 776, 818, 889 см⁻¹ и 966 см⁻¹, характерные для валентных колебаний связей C-C, C-O дезоксирибоз и фрагмента PO₄-молекул нуклеиновых кислот и протеинов [5] ($p < 0,02-0,05$). Достоверное снижение при выраженном фиброзе продемонстрировал также ряд пиков при 1399 см⁻¹, отражающий симметричные валентные колебания групп CH₃ скелетных фрагментов молекул белков; при 1450 см⁻¹, отражающий деформационные колебания групп CH₃ липидов и белков; при 1570 см⁻¹ (амид II); 1581, 1620 см⁻¹ (карбонильные структуры) ($p < 0,01-0,05$). Значимое снижение компоненты при 1635 см⁻¹, выявляющейся при разложении сложных амидных пиков, у пациентов с фиброзом печени F3-F4 связывают со снижением количества белковых молекул со структурой в виде складчатого листа (β-sheet) ($p < 0,05$).

В спектрах комбинационного рассеяния света образцов жидкой сыворотки крови в области 750–1750 см⁻¹ наблюдаются 3 характерных пика поглощения: при 1005, 1157 и 1520 см⁻¹, интенсивность которых оказалась достоверно ниже при наличии фиброза F3-F4 по сравнению с F1-F2 ($p < 0,0058-0,02$) (табл. 2, рис. 5). О природе происхождения этих пиков в литературе к настоящему времени нет единого мнения, однако в большинстве работ они приписываются каротинам. Так, показано, что у онкологических больных снижено содержание каротина в сыворотке крови, что приводит к резкому уменьшению интенсивности сигналов при 1005, 1157 и 1520 см⁻¹ в Raman-спектре [19, 20]. В случае ДПП можно предположить, что снижение площадей вышеуказанных пиков при выраженном фиброзе связано со значительными сдвигами в обмене каротинов, переходе их в витамин А, что тесно связано с состоянием функции печени [2, 12].

Интересный экспериментальный факт, наблюдаемый нами, связан с воздействием на сыворотки кро-

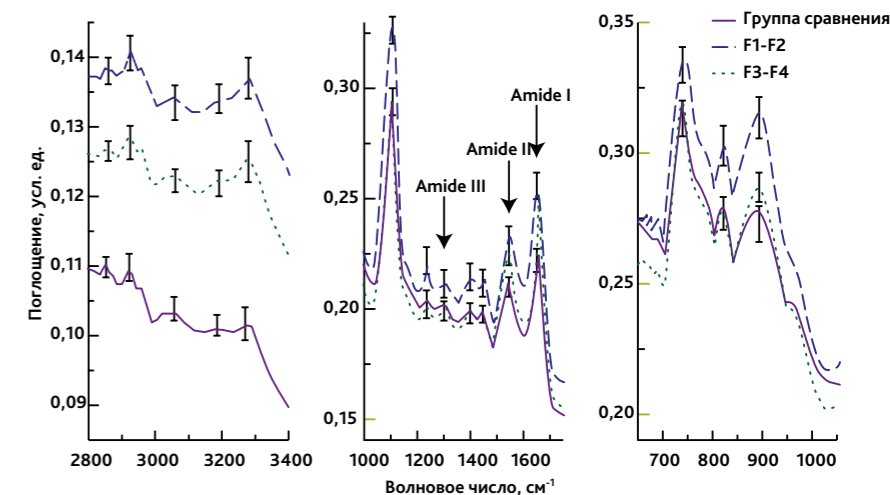


Рисунок 4. ИК-спектры сыворотки крови пациентов с разной степенью фиброза печени и обследуемых группы сравнения (а, б, с – фрагменты ИК-спектров с различным диапазоном волнового числа в см⁻¹)

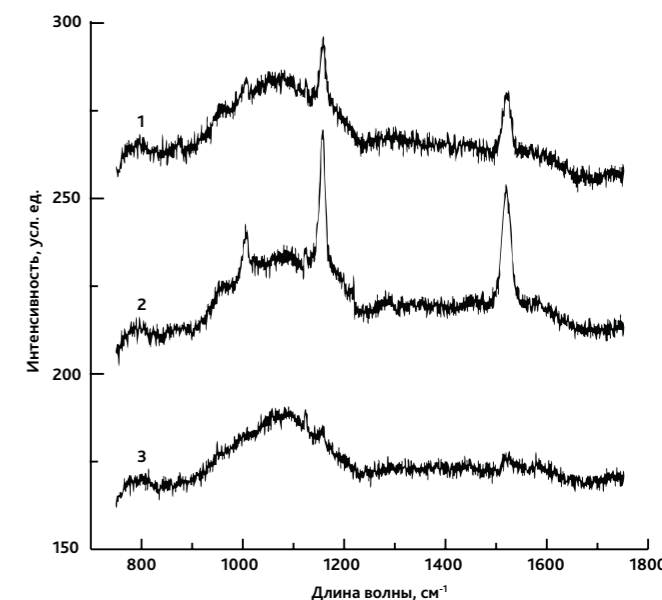


Рисунок 5. Спектры комбинационного рассеяния света образцов жидкой сыворотки крови у пациентов с легким фиброзом F1-F2 (1), тяжелым фиброзом F3-F4 (2) и лиц контрольной группы F0 (3)

Таблица 2. Площадь пиков комбинационного рассеяния света у больных с ДПП с различной степенью фиброза (M±m)

Положение пика, см ⁻¹	Площадь пика, усл. ед.		ρ
	Группа больных со степенью фиброза F1-F2	Группа больных со степенью фиброза F3-F4	
1005	840 ± 133	357 ± 90	< 0,02
1157	2257 ± 411	917 ± 114	< 0,015
1520	2750 ± 174	712 ± 110	< 0,0058

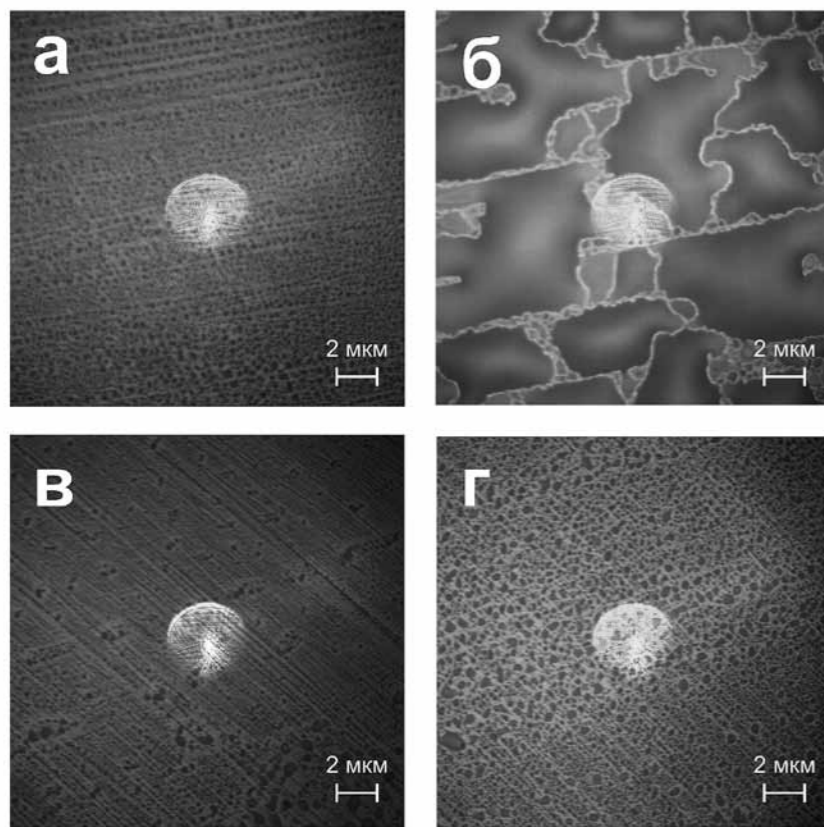


Рисунок 6. Фотография оптической микроскопии поверхности жидкой сыворотки крови пациентов с легким фиброзом (F1-F2) (а, б) и тяжелым фиброзом (F3-F4) (в, г) до (а, в) и после (б, г) воздействия лазерного луча с длиной волны 514,5 нм мощностью 2–3 мВт в течение 3 мин

ви пациентов с разной степенью фиброза лазерным пучком при проведении спектроскопии комбинационного рассеяния света. У обследуемых с легким фиброзом или отсутствием такового поверхность сыворотки была неоднородной, в оптический микроскоп наблюдались отдельные резко очерченные области размером менее 0,5 мкм.

Под действием лазерного излучения происходило слияние и укрупнение областей до 10 мкм и более (рис. 6 а, б). В случаях выраженного фиброза наблюдаемые области оставались практически неизменными (рис. 6 в, г). При локальном нагреве лазерным лучом сыворотки крови возможны изменения, связанные с конформационными изменениями, при более выраженных воздействиях — с денатурацией белковых молекул сыворотки крови с объединением продуктов распада в более крупные области, слияние липопротеидов под действием температуры в укрупненные кластеры. Вероятно, подобные сдвиги носят адаптационный характер при воздействии на организм каких-либо выраженных патологических факторов. Интерес в этом плане вызывает роль термотропных фазовых переходов — скачкообразных изменений степени упорядоченности белков и липидов мембраны под действием ряда факторов (температура, биологически активные вещества,

ультрафиолетовое излучение и др.) [15]. Возможно, при наличии легкого (умеренного) фиброза состояние термотропных фазовых переходов в молекулах белков, липидов (состав и уровень которых не претерпевают существенных сдвигов) близко к нормофизиологическому, что определяет возможность изменений в пределах адаптационных. Как было показано в наших предшествующих работах [6], прогрессирующая патология печени связана с появлением аномальных термотропных фазовых переходов в белках и липидах, причем наиболее стабильным и отражающим глубину повреждения печени является высокотемпературный фазовый переход. Это обстоятельство существенно ограничивает взаимодействие компонентов сыворотки крови при наличии внешнего патологического фактора. Вероятно, подобные изменения и определяют «застывшую» картину сыворотки у пациентов с выраженным фиброзом после воздействия лазерного излучения.

Попытка последующего сочетанного использования полученных оптических различий в параметрах эритроцитов и сыворотки крови для определения степени фиброза базируется на известных фактах тесной взаимосвязи клеток красной крови с компонентами сыворотки. Между ними происходит постоянный взаимообмен липидными компонентами. На уровень вязкости и агрегацию эритроцитов при ДПП определенное влияние оказывают агрегация тромбоцитов, гиперхолестеринемия, гипертриглицеридемия, жирные кислоты, ионный состав сыворотки крови, кинины. Повышение вязкости крови при гиперлипидемии обусловлено способностью липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) влиять на функциональное состояние форменных элементов крови, уменьшать их электрокинетический потенциал, повышая агрегационную способность и ригидность мембран. Так, под влиянием алиментарной гиперлипидемии наблюдается торможение противосвертывающей активности с резкой депрессией фибринолиза и активацией свертывающей системы, ухудшением реологических показателей крови [5, 14]. В работах Т.Я. Леоновой и соавт. [9] установлено, что эритроциты способны адсорбировать на своей поверхности липопротеиды плазмы крови, нагруженные холестерином (в форме липопротеидов высокой, низкой и очень низкой

плотности). Эта возможность определяется содержанием липопротеидов в сыворотке крови и потребностью эритроцитов в холестерине. Между эритроцитами и адсорбированными на их поверхности липопротеидами происходит постоянный обмен холестерина. Наиболее интенсивно протекает обмен холестерина между клетками красной крови и ЛПВП, при этом существенную роль играет фермент лецитин-холестерин-ацилтрансфераза (ЛХАТ) сыворотки крови, синтез которого происходит в печени и в значительной степени определяется ее состоянием. Отсюда следует, что при ДПП 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 липопротеидами сыворотки и клетками крови, с другой — поддерживает в физиологических пределах содержание холестерина 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, оказывает влияние на состояние оптических параметров сыворотки крови [17].

Доказан факт оседания на мембранах эритроцитов крупномолекулярных белков из сыворотки крови, что «экранирует» заряд эритроцита и снижает его дипольный момент, поверхностный отрицательный заряд. F. Streiff и соавт. установили [14], что ζ-потенциал эритроцитов изменяется в зависимости от концентрации белковых фракций. J.F. Stoltz и соавт., в свою очередь, отметили, что глобулиновая фракция способствует резкому снижению электрофоретической подвижности эритроцитов, в то время как альбуминовая практически не оказывает влияния на их подвижность в электрическом поле [21]. В других работах [5, 10] показано, что изменение электрического заряда зависит главным образом от соотношения белковых фракций: чем больше сдвиг от физиологического состояния, тем больше уменьшается электрический заряд. Снижение электрического заряда эритроцитов и повышение уровня глобулинов сыворотки крови связывают с адсорбцией на поверхности клеток глобулиновых молекул, которым присущ более низкий электрический заряд. О том, что глобулины могут адсорбироваться на поверхности эритроцитов независимо от их антигенной структуры, свидетельствуют данные многих исследователей, в том числе и результаты опытов В. Pirofsky, М. Cordowa, Т. Imel (1962). Диспротеинемия с повышением уровня γ-глобулинов наблюдается при ДПП при выраженном иммунновоспалительном синдроме [12]. Можно предположить, что у больных с ДПП снижение электрического заряда эритроцитов обусловлено изменением соотношения белковых фракций.

С другой стороны, известно, что при ДПП в плазме крови происходит возрастание концентрации высокомолекулярного белка фибриногена, который также снижает отрицательный заряд эритроцитов, препятствующий их сближению [16]. По мнению В.А. Левтова и соавт. [8], молекулы фибриногена выполняют функцию мостиков, соединяющих клетки. Адсорбция на поверхности эритроцитов плазменных белков (фибрина, фибриногена) способствует агрегации и адгезии эритроцитов. Это, возможно, является одной из причин выявленного в настоящей работе повышения индекса агрегации эритроцитов у больных с ДПП при исследовании методом диэлектрофореза.

В нашей предшествующей работе установлена корреляция оптических показателей сыворотки крови, интенсивности резонансов ИК-спектров с липидными, белковыми компонентами [4]. Поэтому выявленные связи между электрическими и вязкоупругими параметрами эритроцитов и оптическими показателями сыворотки крови закономерны. Выявлены прямые корреляции толщины пленки с амплитудой деформации эритроцитов ($r = 0,49$, $p < 0,02$), поляризуемостью на высоких частотах ($r = 0,57$, $p < 0,033$ для 1МГц; $r = 0,41$, $p < 0,05$ для 0,5 МГц) и обратные — с обобщенными показателями вязкости ($r = -0,44$, $p < 0,048$), жесткости ($r = 0,40$, $p < 0,05$), электропроводностью ($r = -0,60$, $p < 0,015$). Показатель преломления прямо коррелировал с электропроводностью ($r = 0,53$, $p < 0,05$), индексами деструкции ($r = 0,36$, $p < 0,03$), агрегации ($r = 0,39$, $p < 0,05$) и был обратно связан с емкостью мембран эритроцитов ($r = 0,46$, $p < 0,05$), величиной дипольного момента ($r = 0,39$, $p < 0,04$), амплитудой деформации клеток ($r = 0,44$, $p < 0,05$).

Площадь пиков области амид III при 1280 см⁻¹, 3190 см⁻¹ на ИК-спектрах сыворотки крови прямо и с высокой степенью достоверности коррелировала с амплитудой деформации эритроцитов ($r = 0,62$, $p < 0,03$ для 1280 см⁻¹; $r = 0,58$, $p < 0,014$ для 3190 см⁻¹), поляризуемостью на всех частотах (так на частоте 1МГц — $r = 0,57$, $p < 0,02$ для 1280 см⁻¹; $r = 0,48$, $p < 0,01$ для 3190 см⁻¹). Эти же пики ИК-спектров

Таблица 3. Результаты оценки «панели оптических методов» для выявления степени фиброза печени по сравнению с данными биопсии ($M \pm m$)

Результаты оптических методов исследования	Результаты биопсии печени	
	Группа F3-F4, n = 14	Группа F1-F2, n = 7
Группа F3-F4, n = 12	Истинно положительный Группа F3-F4, n = 11	Ложно положительный Группа F1-F2, n = 1
Группа F1-F2, n = 9	Ложно отрицательный Группа F3-F4, n = 3	Истинно легкий фиброз Группа F1-F2, n = 6

демонстрировали обратную связь с обобщенными показателями вязкости ($r = -0,42$, $p < 0,05$ для 1280 см^{-1} ; $r = -0,49$, $p < 0,048$ для 3190 см^{-1}), жесткости ($r = -0,35$, $p < 0,033$ для 1280 см^{-1} ; $r = -0,50$, $p < 0,05$ для 3190 см^{-1}), индексом деструкции ($r = -0,60$, $p < 0,027$ для 1280 см^{-1} ; $r = -0,45$, $p < 0,018$ для 3190 см^{-1}) и электропроводностью эритроцитов ($r = -0,40$, $p < 0,033$ для 1280 см^{-1} ; $r = -0,37$, $p < 0,05$ для 3190 см^{-1}).

Результаты оценки совокупности оптических методов исследования эритроцитов и сыворотки крови пациентов с ДПП для выявления стадии фиброза по сравнению с данными биопсии печени («золотого стандарта» для оценки стадии фиброза) представлены в табл. 3.

Они показывают достаточно высокие значения чувствительности (78,6%) и специфичности (87,7%), прогностической ценности положительного (91,7%) и отрицательного результата (66,7%), а также индекса точности (81%) [4]. Возросший уровень данных значений по сравнению с изолированным исследованием эритроцитов дает возможность предположить необходимость использования «панели оптических методов» исследования крови для неинвазивной диагностики степени фиброза печени. Особенно важны перспективы в определении ранних стадий фиброза печени (по данным прогностической ценности отрицательного результата).

Выводы

Таким образом, использование совокупности («панели») оптических методов исследования эритроцитов и сыворотки крови пациентов с ДПП позволяет достигать высоких показателей чувствительности, специфичности, индекса точности, получить возможность выявлять не только выраженный фиброз, но, что особенно важно, фиброз печени на ранних стадиях. Выявленные возможности оптических методов являются весьма перспективными в скрининговом неинвазивном определении стадий заболевания при ДПП различного генеза.

- Исследование системы крови в клинической практике / Под ред. Г.И. Козинца, В.А. Макарова. М.: Изд-во «Триада-Х», 1997. 480 с.
- Кручинина М.В. Структурно-функциональные свойства эритроцитов при соматической патологии алкогольного генеза. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Новосибирск, 1994. 26 с.
- Кручинина М.В., Курилович С.А., Паруликова М.В., Громов А.А., Бакиров Т.С., Генералов В.М., Лак А.В. Вязкоупругие и электрические характеристики эритроцитов при различной степени фиброза печени // Вестник НГУ. 2005. Т. 3, Вып. 4. С. 43–52.
- Левтов В.А., Резирер С.А., Шадрин Н.Х. Реология крови. М.: Медицина, 1982. 271 с.
- Леонова Т.Я. К вопросу об эритроцитарном механизме регуляции холестерина при экспериментальной гиперхолестеринемии и ишемической болезни сердца. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Новосибирск, 1982. 22 с.
- Мирошников А.И., Фомченков В.М., Иванов А.Ю. Электрофизический анализ и разделение клеток. М.: Наука, 1986. 156 с.
- Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степоява Е.А. Физиология и патология эритроцита. Томск: Из-во ТГУ, 2004. 202 с.
- Подымова С.Д. Болезни печени. М.: Медицина, 1993. 544 с.
- Рыхлицкий С.В., Спесивцев Е.В., Швец В.А., Прокопьев В.Ю. Спектральный эллипсометрический комплекс «ЭЛЛИПС-1771» // Приборы и техника эксперимента. 2007. № 2. С. 160–161.
- Страйер Л. Биохимия. Пер. с англ. М.: Мир, 1984. Т. 3. 396 с.
- Черницкий Е.А., Воробей А.В. Структура и функции эритроцитарных мембран. Минск: Наука и техника, 1981. 260 с.
- Чижевский А.Л. Биофизические механизмы реакции оседания эритроцитов. Новосибирск: Наука, 1980. 177 с.
- Шиффман Ф.Д. Патология физиологии крови. Пер. с англ. Е.Б. Жибурта, Ю.Н. Токарева. М., СПб: «Издательство БИНОМ», «Невский диалог», 2000. 448 с.
- Dimitriev Y., Ivanova Y., Iordanova R. History of sol-gel science and technology (review) // Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy. 2008. Vol. 43, № 2. P. 181–192.
- Manoharan R., Wang Y., Feld M.S. Histochemical analysis of biological tissues using Raman spectroscopy // Spectrochimica Acta Part A. 1996. Vol. 52. P. 215–249.
- Schut T.C.B., Puppels G.J., Kraan Y.M., Greve J., van der Maas L. L.J., Figdor C.G. Intracellular carotenoid levels measured by Raman microspectroscopy: comparison of lymphocytes from lung cancer patients and healthy individuals // Int. J. Cancer (Pred. Oncol.). 1997. Vol. 74. P. 20–25.
- Stoltz J.F., Raffoux C., Genetet B., Vigneron C., Streiff F., Larcan A. Modification of the osmotic resistance and the electrophoretic mobility of erythrocytes during hemolytic diseases with antibodies (auto and iso-antibodies). Comparison with sensitized erythrocytes in vitro // Biorheology. 1973. Vol. 10, № 4. P. 605–609.
- Vorotilov K., Petrovsky V., Vasiljev V. Spin coating process of sol-gel silicate films deposition: effect of spin speed and processing temperature // Journal of Sol-Gel Science and Technology. 1995. Vol. 5. P. 173–183.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Минобрнауки РФ (ГК № 02.740.11.0556), гранта РФФИ 11-02-12171-офи-м при использовании оборудования ЦКП СЦСТИ в рамках ГК № 16.552.11.7044 и при использовании оборудования научно-образовательного комплекса НГУ «Наносистемы и современные материалы».

Список литературы

- Воевода М.И., Пельтек С.Е., Кручинина М.В., Курилович С.А., Кручинин В.Н., Могильников К.П., Рыхлицкий С.В. Исследование тонких пленок, полученных центрифугированием сыворотки крови человека, методами спектральной эллипсометрии и ИК-спектроскопии // Автоматизация. 2010. Т. 46, № 4. С. 106–120.
- Гастроэнтерология. Национальное руководство / Под ред. В.Т. Ивашкина, Т.Л. Лапиной. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. 700 с.
- Генералов В.М., Кручинина М.В., Дурыманов А.Г., Медведев А.А., Сафатов А.С., Сергеев А.Н., Бурык Г.А., Курилович С.А., Громов А.А. Диэлектрофорез в диагностике инфекционных и неинфекционных заболеваний. Новосибирск: Изд-во «ЦЭРИС», 2011. 172 с.
- Гринхальх Т. Основы доказательной медицины. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2004. 240 с.

УДК 616.36-003.826-008.6(045)

**А.Б. Кривошеев^{1*}, В.Н. Максимов^{1,2}, А.Д. Куимов¹,
В.Ю. Ивасько¹, О.Н. Коваль², Д.Б. Даниленко¹,
М.А. Кондратова¹, М.И. Воевода²**

¹ ГБОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет, кафедра факультетской терапии

² ФГБУ Научно-исследовательский институт терапии Сибирского отделения РАМН, лаборатория молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний, г. Новосибирск

АЛЛЕЛИ 282Y И H63D ГЕНА HFE И ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬ К СИНДРОМУ ХРОНИЧЕСКОЙ ПЕРЕГРУЗКИ ЖЕЛЕЗОМ И НАРУШЕНИЮ ПОРФИРИНОВОГО ОБМЕНА ПРИ НЕАЛКОГОЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ БОЛЕЗНИ ПЕЧЕНИ

Резюме

Выполнено тестирование на носительство мутаций C282Y и H63D в гене HFE у 57 больных неалкогольной жировой болезнью печени (НЖБП). Нарушения в обмене порфиринов зарегистрированы у 39 (68,4%), мутации C282Y и H63D обнаружены у 16 (28,1%) обследованных, из них у 12 человек с различными вариантами дисметаболизма порфиринов и признаками синдрома хронической перегрузки железом. У 41 (71,9%) больного без изучаемых мутаций нарушения метаболизма порфиринов выявлены у 27 (65,8%). Признаки синдрома хронической перегрузки железом у них отсутствовали. Обнаружение мутаций C282Y и H63D в гене HFE в сочетании с расстройствами порфиринового обмена на фоне синдрома хронической перегрузки железом, вероятно, позволит рассматривать таких больных как кандидатов на включение в группу повышенного риска формирования фиброза печени.

Ключевые слова: неалкогольная жировая болезнь печени, мутации C282Y и H63D гена HFE, синдром хронической перегрузки железом, обмен порфиринов.

Abstract

Testing for carriers of mutations C282Y and H63D HFE gene in 57 patients with nonalcoholic fatty liver disease was completed. Abnormalities in the metabolism of porphyrins were detected in 39 (68.4%) patients, mutations C282Y and H63D were detected in 16 (28.1%) patients, of whom 12 patients with metabolic disorders of porphyrins and symptoms of the syndrome of chronic iron overload. In 41 (71.9%) patients without the mutations found disorders metabolism of porphyrins were in 27 (65.8%) patients. They had no symptoms of the syndrome of chronic iron overload. Detection of C282Y and H63D mutations in the gene HFE in conjunction with disorders of porphyrin metabolism in association with the syndrome of chronic iron overload, but the probability will consider these patients as candidates for inclusion in the higher risk of formation of liver fibrosis.

Key words: nonalcoholic fatty liver disease, mutations C282Y and H63D gene HFE, a syndrome of chronic iron overload, porphyrin metabolism.

В настоящее время активно проводятся генетические исследования, целью которых является идентификация генов-кандидатов, ассоциирующихся с увеличением риска развития хронических диффузных заболеваний печени (ХДЗП) [7, 10, 13, 20, 23]. Кроме того, проводятся исследования ассоциаций полиморфизма генов-кандидатов с течением и прогрессированием ХДЗП. Поскольку еще велика доля генов с неустановленной функцией, выполняются полногеномные исследования для идентификации однонуклеотидных полиморфизмов, ассоциированных с ХДЗП, а также установлено около 2,5 млн полиморфизмов отдель-

ных нуклеотидов, при изучении которых возможно выявление генов, позволяющих предположить не только развитие определенной патологии, но и ее вероятное течение и прогрессирование [9, 16].

Специфические нарушения порфиринового обмена при манифестной поздней кожной порфирии в связи с многообразными клиническими проявлениями привлекают внимание специалистов различных медицинских профилей. Имеются сообщения, что до 73% больных поздней кожной порфирией являются гетеро- или гомозиготными носителями мута-

* Контакты. E-mail: krivosheev-ab@narod.ru. Телефон: (383) 226-66-14