

М.В. Кручинина<sup>1\*</sup>, С.А. Курилович<sup>1</sup>, М.И. Воевода<sup>1</sup>, Е.Г. Немцова<sup>1</sup>,  
А.А. Громов<sup>1</sup>, В.М. Генералов<sup>2</sup>, К.В. Генералов<sup>2</sup>, А.С. Сафатов<sup>2</sup>,  
А.Г. Покровский<sup>3</sup>, В.О. Пустыльяк<sup>3</sup>, С.В. Чересиз<sup>3</sup>, Г.Р. Сакаева<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Научно-исследовательский институт терапии» СО РАМН, г. Новосибирск

<sup>2</sup> ФГБУ «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», п. Кольцово, Новосибирская обл.

<sup>3</sup> ФГБОУ ВПО «Новосибирский государственный университет», г. Новосибирск

## ХРОНИЧЕСКИЙ ВИРУСНЫЙ ГЕПАТИТ В: ВЗАИМОСВЯЗЬ ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ И ВЯЗКОУПРУГИХ ХАРАКТЕРИСТИК ЭРИТРОЦИТОВ С ВИРУСНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

### Резюме

Исследованы особенности электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов, полученных методом диэлектрофореза у пациентов с ХВГВ в зависимости от УВН. Установлено, что обобщённые жёсткость, вязкость, электрическая проводимость, индексы агрегации, деструкции, относительная поляризуемость достоверно увеличивались, а поляризуемость на всех частотах, скорость движения клеток к электродам, электрическая ёмкость мембран эритроцитов снижались по мере нарастания виремии. Выраженное изменение параметров эритроцитов у пациентов с высоким УВН, вероятно, отражает выраженную степень дезадаптации клеток красной крови. Установлены корреляции электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов с биохимическими показателями, отражающими уровень диспротеинемии, цитолиза, иммуно-воспалительного синдрома. Полученные данные позволяют дополнить представления о патогенезе системных проявлений вирусного гепатита В и ассоциаций высокой вирусной нагрузки со значимым изменением ряда вязкоэластических и электрических свойств эритроцитов.

**Ключевые слова:** хронический вирусный гепатит В, вирусная нагрузка, диэлектрофорез, эритроциты.

### Abstract

The features of the electrical and viscoelastic parameters of red blood cells obtained by dielectrophoresis in patients with chronic hepatitis B in depending on the level of viral load were investigated. It has been found that the summerized rigidity, viscosity, conductivity, index of aggregation and destruction, the relative polarizability significantly increased and polarizability at all frequencies, the velocity of cells to the electrodes, electric capacitance of membranes — decreased as ascending viremia. A marked change in the parameters of red blood cells in patients with high viral load, likely, reflects the expressed degree of disadaptation of erythrocytes. Correlation of electrical and viscoelastic parameters erythrocytes with the biochemical indices reflecting the level of dysproteinemia, cytolysis, immune-inflammatory syndrome have been installed. The data obtained allow us to supplement understanding of the pathogenesis of systemic manifestations of virus hepatitis B and association of high viral load with a significant change in the viscoelastic and electrical properties of red blood cells.

**Key words:** chronic viral hepatitis B, viral load, dielectrophoresis, erythrocytes.

АЛТ — аланинаминотрансфераза, АСТ — аспартатаминотрансфераза, ГГТП — гамма-глутамилтранспептидаза, ГЦК — гепатоцеллюлярная карцинома, ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота, ИГА — индекс гистологической активности, НПЭП — неоднородное переменное электрическое поле, УВН — уровень вирусной нагрузки, ХВГВ — хронический вирусный гепатит В, ЦП — цирроз печени.

В настоящее время продолжается активное изучение молекулярной биологии HBV-инфекции и её связи с клиническими характеристиками основных вариантов течения ХВГВ. Появление методов генодиагностики позволило улучшить диагностику ХВГВ и выделять хроническую HBV-инфекцию с высокой и низкой репликативной активностью. В прошлом уровень виремии ДНК HBV  $10^5$  копий/мл являлся пределом чувствительности неамплификационных методов (гибридизация). Пациенты с уровнем ДНК HBV в крови менее  $10^5$  копий/мл считались ДНК HBV-негативными и при наличии постоянно нормальной

активности АЛТ считались неактивными носителями HBsAg [18].

С внедрением в практику амплификационных методов выявления ДНК (чувствительность большинства коммерческих амплификационных тест-систем составляет  $10^2$ – $10^5$  копий ДНК в 1 мл образца) стало ясно, что у неактивных носителей HBsAg концентрация ДНК HBV может варьировать в пределах  $10^3$ – $10^4$  копий/мл, также у части анти-HBs-позитивных реконвалесцентов гепатита В выявляются низкие концентрации ДНК HBV в крови ( $10^2$ – $10^5$  копий/мл) [24].

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

Проведённые за последние 10 лет крупномасштабные длительные проспективные когортные исследования выявили взаимосвязь между постоянно высоким УВН и неблагоприятными исходами заболевания — ЦП и ГЦК. Продемонстрирована корреляция вирусной нагрузки с ИГА; также было показано, что постоянно высокий УВН достоверно повышает риск развития ЦП и ГЦК [19, 20].

В проблеме диффузных поражений печени особая роль отводится изменениям на уровне клеточных мембран. Все плазматические мембраны, несмотря на некоторые структурно-функциональные особенности, имеют одинаковую схему строения. Исследователями показана возможность использования структурно-функциональных характеристик мембраны эритроцита в качестве модели для изучения других мембран, недоступных прямому исследованию, в том числе гепатоцитов [4]. Эритроцитарная мембрана является своеобразным «зеркалом», отражающим состояние других клеточных мембран. При этом данные литературы и собственные предшествующие исследования показывают, что мембраны эритроцитов подвергаются значительным изменениям под действием вирусов различных типов (гриппа, краснухи и др.), и эти сдвиги носят дозозависимый характер, т.е. связаны с УВН [2, 3]. В отношении вируса гепатита В известно, что повреждение печени при хронической HBV-инфекции имеет иммуноопосредованный характер, т.к. вирус гепатита В не обладает прямым цитопатическим действием [6]. Эритроциты оказываются вовлечёнными в этот процесс, поскольку известно, что мембраны клеток красной крови «переносят» иммуноглобулины и иммунные комплексы [12]. С другой стороны, сдвиги в электрических и вязкоупругих параметрах эритроцитов усугубляют течение диффузных заболеваний печени, приводя к нарушениям микроциркуляции и тканевой гипоксии.

Данные по взаимозависимости электрических, вязкоупругих параметров эритроцитов и вирусной активности при ХВГВ (как и при других вирусных гепатитах) отсутствуют. В то же время они могут углубить знания о патогенетических механизмах воздействия вирусов гепатитов на клетки и, возможно, подскажут дополнительные пути гепатопротекции.

**Цель исследования:** изучить особенности вязкоупругих и электрических характеристик эритроцитов в зависимости от уровня виремии при ХВГВ.

## Материалы и методы

Обследовано 32 пациента с ХВГВ (средний возраст  $47,6 \pm 5,4$  года), в том числе 17 с низкой (2-я группа) и 15 с высокой вирусной нагрузкой (3-я группа). Уровень виремии считали низким при  $10^4$  копий/мл и менее, высоким — при  $10^5$  и более копий/мл [7].

Вследствие того, что у пациентов с низкой вирусной нагрузкой проводится динамическое наблюдение без назначения противовирусной терапии, а высокая виремия — показание к назначению противовирусных препаратов, больные данных групп анализировались отдельно. Больные с высокой вирусной нагрузкой обследовались до назначения противовирусной терапии.

Группа сравнения (1-я группа) включала 27 практически здоровых мужчин в возрасте от 35 до 60 лет, ведущих здоровый образ жизни и употребляющих алкоголь не чаще 1–2-х раз в месяц, у которых при обследовании не выявлено маркёров вирусных гепатитов, признаков заболеваний печени и другой патологии внутренних органов.

У большинства обследованных пациентов степень фиброза соответствовала лёгкой или умеренной степени (F1–F2). У преобладающего числа больных (26 человек) она определялась макроморфологическими методами визуализации (УЗИ, КТ, ЯМРТ, непрямая эластометрия). У 6 пациентов выполнена биопсия печени, показавшая минимальную или умеренную активность гепатита. В группе сравнения биопсия печени не проводилась по этическим соображениям. Всем обследуемым выполнены биохимические и инструментальные исследования, УЗИ печени, селезёнки, а также портальных сосудов. Вирусная этиология заболевания установлена на основании обнаружения серологических маркёров ХВГВ иммуноферментным анализом и вирусной ДНК методом полимеразноцепной реакции, в том числе в режиме real-time (при чувствительности метода  $10^3$  копий/мл) [7, 9]. Для исследований использованы наборы реагентов, тест-системы и оборудование ЗАО «НПФ ДНК-технология» (г. Москва), молекулярно-биологическое исследование на наличие в крови ДНК вируса гепатита В, выявление серологических маркёров проводилось в ООО «Лаборатория ДНК-диагностика» (г. Барнаул).

У пациентов с ХВГВ с низкой вирусной нагрузкой были положительными следующие серологические маркёры — HBsAg, анти-HBe, анти-HBcor IgG. В группе пациентов с низкой вирусной нагрузкой биопсия печени была выполнена в 2-х случаях, при этом гистологическая активность соответствовала умеренной степени (от 9 до 12 баллов) у 1 мужчины, второй пациент имел минимальную степень (от 4 до 8 баллов). Степень фиброза в обоих случаях соответствовала F1. По данным макроморфологических методов визуализации, у остальных пациентов в 10 случаях определена лёгкая степень фиброза (F1), у 5 обследуемых — умеренная (F2). Биохимическая активность у большей части пациентов с низкой виремией оказалась минимальной (11 человек): уровень трансаминаз, ГГТП не превышал 3 N, изменения в соотношении белковых фракций не выявлено. У 6 пациентов данной группы биохимическая активность соот-

ветствовала умеренной степени: уровень АЛТ и АСТ находился в пределах 3–5 N, отмечено повышение уровня общего билирубина, фибриногена, протромбинового индекса, была выявлена лёгкая диспротеинемия — незначительное снижение уровня альбуминов и нерезкое повышение  $\alpha_2$ - и  $\gamma$ -глобулинов.

У пациентов ХВГВ с высокой вирусной нагрузкой определялись HBsAg, анти-HBcor, анти-HBe IgG; у 7 пациентов выявлен HBeAg (46,7%), у 5 — анти-HBcore IgM (33,3%). Пациентам с высокой вирусной нагрузкой биопсия печени произведена в 4 случаях. У 1 больного была установлена умеренная степень гистологической активности, в 3 случаях — высокая; степень фиброза соответствовала FII. У остальных 11 обследуемых методом непрямо́й эластометрии в 6 случаях установлена лёгкая (F1), в 5 — умеренная степень фиброза печени (FII). Больные с высоким и очень высоким уровнем виремии имели умеренную биохимическую активность в более чем в половине случаев (8 человек), у остальных пациентов (7 мужчин) она была высокой. У пациентов с высокой биохимической активностью выявлены уровни трансаминаз, превышающие 10 N, ГГТП — 5 N, билирубина со значительным преобладанием непрямо́й фракции ( $71,8 \pm 5,1$  мкмоль/л). Отмечен повышен-

ный уровень фибриногена ( $5,9 \pm 0,3$  г/л), некоторое снижение протромбинового индекса ( $71 \pm 1,4\%$ ). Диспротеинемия в данной группе оказалась значительно выраженной: уровень альбуминов составил  $43,6 \pm 0,7\%$ ,  $\alpha_2$ - и  $\gamma$ -глобулины повысились до  $11,7 \pm 0,4\%$  и  $23,7 \pm 0,8\%$  соответственно.

Анализ биохимических параметров по группам пациентов с низкой и высокой вирусной нагрузкой выявил наличие достоверных различий по большей части показателей (табл. 1). Наивысший уровень различий установлен для уровней билирубина (в том числе пофракционных), трансаминаз, ГГТП, белковых фракций ( $p < 0,01$ – $0,001$ ).

Обследование выполнено с одобрения Этического комитета ФГБУ «НИИ терапии» СО РАМН (протокол заседания № 36 от 18 сентября 2012 г.). Все обследуемые подписывали информированное согласие пациента на участие в обследовании.

У больных с верифицированными диагнозами, а также у мужчин группы сравнения исследованы структурно-функциональные параметры эритроцитов методами диэлектрофореза (патент на изобретение № 2296327 от 30.08.2004).

Таблица 1. Биохимические параметры и данные инструментальных методов у пациентов с ХВГВ с различной вирусной активностью

Группы обследованных	Биохимические параметры										
	Общий билирубин (ммоль/л)	Прямой билирубин (ммоль/л)	АЛТ (u/l)		АСТ (u/l)		ГГТП (u/l)				
2-я группа, низкая вирусная нагрузка (n = 17)	30,2 ± 3,4	6,1 ± 0,7	56,9 ± 5,5		51,3 ± 4,8		50,1 ± 4,0				
3-я группа, высокая вирусная нагрузка (n = 15)	77,2 ± 8,4	22,0 ± 3,8	135,5 ± 16,9		123,9 ± 12,6		116,7 ± 10,6				
p <	0,001	0,001	0,001		0,001		0,001				
Группы обследованных	Общий холестерин (мг/дл)	Холестерин ЛПВП (мг/дл)	Триглице-риды (мг/дл)		Альбумины (г/л)		Гамма-глобулины (%)				
2-я группа, низкая вирусная нагрузка (n = 17)	191,4 ± 6,7	42,15 ± 1,7	198,0 ± 9,7		49,7 ± 0,8		16,36 ± 0,67				
3-я группа, высокая вирусная нагрузка (n = 15)	227,6 ± 6,6	39,2 ± 1,5	232,7 ± 7,6		46,9 ± 1,2		21,4 ± 1,63				
p <	0,001	0,1	0,01		0,05		0,02				
Группы обследованных	Альфа 2-глобу-лины (%)	Фибри-ноген (г/л)	Протром-биновый индекс (%)	Степень фиброза		Степень гис-тологической активности			Степень био-химической активности		
				F1	F2	мини-мальная	умерен-ная	высокая	мини-мальная	умерен-ная	высокая
2-я группа, низкая вирусная нагрузка (n = 17)	8,35 ± 0,29	4,0 ± 0,27	88,0 ± 2,3	40	7	1	1	0	11	6	0
3-я группа, высокая вирусная нагрузка (n = 15)	10,3 ± 0,4	5,1 ± 0,25	81,1 ± 3,0	6	9	0	1	3	0	8	7
p <	0,01	0,01	0,058								

Примечание. В данных инструментальных методов исследования указано число пациентов каждой группы.

Для проведения исследований кровь объёмом 2 мл забирали вакутайнерами 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 производились измерения. В измерительной ячейке на клетки воздействовали НПЭП со следующими параметрами: напряжённость электрического поля  $10^5$  В/м, градиент напряжённости электрического поля  $10^{11}$  В/м<sup>2</sup>, частотный диапазон  $5 \cdot 10^4$ – $10^6$  Гц.

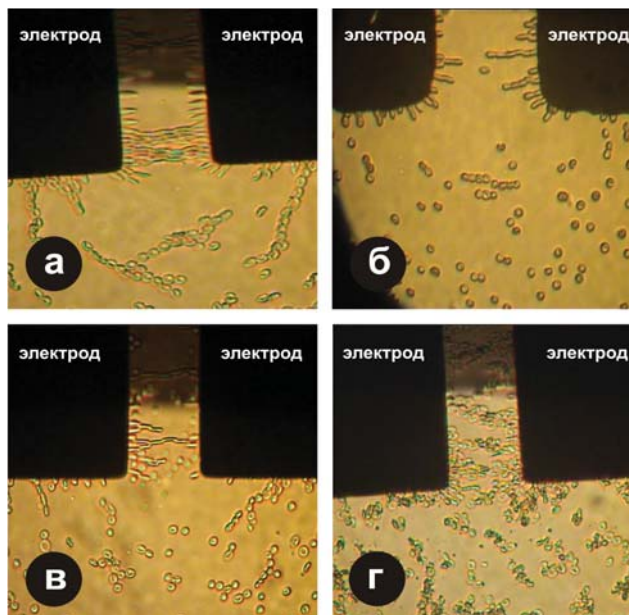
Изучение электрических и вязкоупругих характеристик эритроцитов проводили на четырёх фиксированных частотах, где оценивали поляризуемость клеток, относительную поляризуемость, обобщённые показатели жёсткости, вязкости, электропроводность, амплитуду деформации эритроцитов, индексы агрегации, деструкции клеток, ёмкость мембран эритроцитов, скорость движения клеток к электродам, положение равновесной частоты. Методики измерения и расчёты показателей описаны ранее [3].

Для распознавания образа клеток и компьютерной обработки данных использовался пакет оригинальных программ Cellfind. Ошибка воспроизводимости метода — 7–12%. Статистическая обработка данных выполнена с использованием программы SPSS, ver. 10. Достоверность различия показателей оценивали по критериям Стьюдента, Пирсона в случае, когда распределение подчинялось нормальному закону; в случаях отклонения распределения от нормального закона использовались непараметрические критерии (U-критерий Манна–Уитни, Колмогорова–Смирнова) [4].

## Результаты и обсуждение

Наблюдения за характером поведения эритроцитов в НПЭП показали, что эритроциты здоровых лиц (1-я группа,  $n = 27$ ) на частотах  $5 \cdot 10^5$  и  $10^6$  Гц обнаружили ярко выраженную способность к деформации (рис. 1а). Они вытягивались и приобретали высокую поступательную скорость в сторону ближайшего электрода. На частотах  $5 \cdot 10^4$  и  $10^5$  Гц деформации не наблюдалось, клетки отталкивались от электродов (отрицательный диэлектрофорез), единичные клетки под действием поля разрушались или образовывали отдельные агрегаты малых размеров.

У больных с ХВГВ взаимодействие эритроцитов с НПЭП было другим, при этом наблюдались отличия, связанные с уровнем виремии (табл. 2). В таблице представлены параметры эритроцитов пациентов 2-й группы с низкой вирусной нагрузкой ( $n = 17$ ) и 12 больных 3-й группы с высокой вирусной нагрузкой ( $n = 12$ ). Отметим, что 3 пациента 3-й группы с очень высоким уровнем виремии (более  $10^{6-7}$  копий/мл) анализировались отдельно, поскольку значения пара-



**Рисунок 1.** Разделение и деформация эритроцитов под действием НПЭП 1 МГц

А — у лиц группы сравнения; Б — у больных с ХВГВ (сниженная амплитуда деформации эритроцитов); В — повышенный гемолиз эритроцитов у больных с ХВГВ; Г — повышенное агрегатообразование и гемолиз у пациентов с ХВГВ с высокой вирусной нагрузкой.

метров эритроцитов у них отличались на порядок от таковых в группе с высоким УВН.

У пациентов с невысокой вирусной нагрузкой отмечено наличие небольшого количества агрегатов эритроцитов малых и средних размеров. По мере нарастания вирусной нагрузки склонность к образованию агрегатов значительно возрастала: отмечалось преобладание агрегатов крупных и гигантских размеров, обладающих низким зарядом. Поэтому агрегаты обладали низкой скоростью движения к электродам или совсем не двигались, прилипая к стеклу. По данным литературы известно, что при снижении электрического заряда силы отталкивания между клетками уменьшаются, барьер устраняется, и, вследствие действия сил притяжения, клетки агглютинируют. Однако, даже когда нет агглютинации, сниженный заряд эритроцитов уменьшает их стабильность [10, 12].

Снижение отрицательного поверхностного заряда эритроцитов, отражаемого сниженной скоростью движения эритроцитов к электродам, по мере нарастания уровня вирусной нагрузки может быть обусловлено следующими обстоятельствами. Изменения дзета-потенциала эритроцитов обусловлены не только нарушением метаболизма клетки (последний обеспечивает создание потенциал-определяющего заряда), но и количественными и качественными изменениями компонентов суспензионной среды (плазмы) [10]. Streiff и соавт. установили [15], что дзета-потенциал эритроцитов изменяется в за-

**Таблица 2.** Вязкоупругие и электрические характеристики эритроцитов у больных с ХВГВ с различным уровнем вирусной нагрузки ( $M \pm m$ )

Показатели эритроцитов	1-я группа, сравнения (n = 27)	2-я группа, низкая вирусная нагрузка (n = 17)	3-я группа, высокая вирусная нагрузка (n = 12)
Амплитуда деформации, м	$(2,9 \pm 0,5) \cdot 10^{-6}$	$(1,1 \pm 0,4) \cdot 10^{-6**}$	$(0,6 \pm 0,1) \cdot 10^{-6***}$
Обобщённый показатель жёсткости, Н/м	$(3,9 \pm 0,4) \cdot 10^{-6}$	$(5,1 \pm 0,4) \cdot 10^{-6*}$	$(6,5 \pm 0,5) \cdot 10^{-6****}$
Обобщённый показатель вязкости, Па·с	$0,31 \pm 0,07$	$0,45 \pm 0,05$	$0,62 \pm 0,03****^{\wedge}$
Индекс агрегации Eг, усл. ед.	$0,51 \pm 0,05$	$0,61 \pm 0,06$	$0,74 \pm 0,05****^{\wedge}$
Индекс деструкции Eг, %	$0,9 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,7$	$7,4 \pm 1,2****^{\wedge}$
Электропроводность клеток, См/м	$(2,4 \pm 0,3) \cdot 10^{-5}$	$(4,3 \pm 0,6) \cdot 10^{-5***}$	$(6,2 \pm 0,4) \cdot 10^{-5****^{\wedge}}$
Ёмкость клеток, Ф	$(7,3 \pm 0,4) \cdot 10^{-14}$	$(5,2 \pm 0,9) \cdot 10^{-14*}$	$(2,5 \pm 0,4) \cdot 10^{-14****^{\wedge}}$
Скорость движения Eг к электродам, мкм/с	$11,2 \pm 1,9$	$8,4 \pm 2,2$	$5,4 \pm 1,8^*$
Положение равновесной частоты, Гц	$(4,9 \pm 0,4) \cdot 10^5$	$(5,6 \pm 0,4) \cdot 10^5$	$(7,2 \pm 0,6) \cdot 10^5****^{\wedge}$

Примечание. М — средняя арифметическая вариационного ряда, m — средняя ошибка средней арифметической [11]. \* — статистическая значимость отличия от 1-й группы (\* —  $p < 0,05$ , \*\* —  $p < 0,01$ , \*\*\* —  $p < 0,001$ ); ^ — статистическая значимость отличия от 2-й группы (^ —  $p < 0,05$ , ^\* —  $p < 0,02$ , ^^ —  $p < 0,001$ ).

висимости от концентрации белковых фракций. 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. В других работах [16] 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 [10, 12]. Диспротеинемия с повышением уровня гамма-глобулинов наблюдается в случаях хронических вирусных поражений печени [13].

При интегративной стадии ХВГВ относительно чаще наблюдаются внепечёночные изменения, в патогенезе которых определённое значение придают микротромбозу разной локализации, развивающемуся в результате циркуляции иммунных комплексов. Основное значение имеет иммунный комплекс HBsAg-анти-HBs как наиболее крупный. Другие иммунные комплексы, например, HBeAg-анти-HBe, имеют меньшие размеры, что определяет их относительно меньший повреждающий эффект. При образовании циркулирующих иммунных комплексов «цементирующим» началом становится С3-компонент комплемента, содержание которого у больных ХВГВ, в отличие от острого, часто снижено.

Одним из возможных факторов, снижающих поверхностный заряд эритроцитов при хронических вирусных гепатитах, является развитие смешанной криоглобулинемии 2-го типа. Критерием этого слу-

жит установление повышенного содержания аутоантител, в частности ревматоидного фактора. Причём высокий уровень аутоантител находят не только в сыворотке крови, но и, это особенно информативно, в криопреципитатах биоптатов печени. Признаки смешанной криоглобулинемии 2-го типа выявляются и при заболеваниях печени иной этиологии, однако с существенно меньшей частотой.

Кроме рассмотрённых выше повышенных уровней антител, аутоантител, циркулирующих иммунных комплексов, связанных с развитием вирусной инфекции, снижение электрического заряда эритроцитов у больных с ХВГВ может быть обусловлено изменением соотношения белковых фракций сыворотки крови, нарастанием уровня крупномолекулярных про- и воспалительных белков.

Известно, что при поражениях печени в плазме крови происходит возрастание концентрации высокомолекулярного белка — фибриногена, который также снижает отрицательный заряд эритроцитов, препятствующий их сближению [5]. По мнению В.А. Левтова и соавт. [11], молекулы фибриногена выполняют роль «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 ХВГВ при исследовании методом диэлектрофореза. Выявлены прямые корреляции уровня фибриногена и индекса агрегации эритроцитов у пациентов с высокой и очень высокой вирусной нагрузкой ( $r = 0,71$ ,  $p < 0,02$ ) и обратные — со скоростью движения клеток к электродам ( $r = -0,51$ ,  $p < 0,05$ ). В результате сладжированные эритроциты, гликопротеины, продукты деградации фибриногена и фибрина увеличивают вязкость крови, вследствие чего замедляется скорость кровотока, наступает стаз и обтурация просвета капилляров эритроцитами с

их последующей гибелью. Данные нарушения приводят к значительному уменьшению числа функционирующих капилляров [10].

Адсорбция на поверхности эритроцитов иммуноглобулинов, циркулирующих иммунных комплексов, фибриногена приводит к существенному изменению толщины мембран эритроцитов, что отражается изменением электрической ёмкости клеток. Действительно, по мере нарастания вирусной нагрузки при ХВГВ отмечено достоверное снижение ёмкости клеток, что может быть объяснено адсорбцией на мембране эритроцитов описанных ранее иммунных комплексов HBsAg-анти-HBs и HBeAg-анти-HBe. Вероятная адсорбция криоглобулинов на поверхности мембран эритроцитов в меньшей степени, но также может влиять на величину ёмкости клеток.

Утолщение мембран эритроцитов при ХВГВ в определённой степени связано с диспротеинемией. Получены прямые корреляции электрической ёмкости мембран эритроцитов с уровнем альбуминов ( $r = 0,54$ ,  $p < 0,02$ ) и обратные — с уровнем  $\gamma$ -глобулинов ( $r = -0,48$ ,  $p < 0,01$ ). Кроме того, высокий уровень фибриногена также увеличивает толщину мембран эритроцитов (связь ёмкости мембран с уровнем фибриногена  $r = -0,52$ ,  $p < 0,001$ ), адсорбируясь на них, снижая отрицательный поверхностных заряд клеток посредством его экранирования.

Одним из важных факторов, определяющих кровоток на уровне микроциркуляторного русла, является способность эритроцитов к деформации. Способность эритроцита к деформации обусловлена жидким характером клеточного содержимого, эластичностью эритроцитарной мембраны и относительным избытком поверхностной площади мембраны по отношению к внутриэритроцитарному объёму.

По мере нарастания вирусной нагрузки при ХВГВ отмечено снижение амплитуды деформации клеток, не достигающее, однако, уровня достоверности различий. Обобщённые показатели вязкости, жёсткости, электропроводность при нарастании вирусной активности достоверно увеличивались ( $p < 0,0001-0,05$ ).

У пациентов с ХВГВ с различным уровнем вирусной активности изменялось положение равновесной частоты. В случаях малой вирусной нагрузки отмечено незначительное смещение равновесной частоты от  $5 \cdot 10^5$  Гц в обе стороны частотного диапазона (от  $4 \cdot 10^5$  до  $6 \cdot 10^5$  Гц). По мере возрастания нагрузки выявлено нарастающее смещение равновесной частоты в высокочастотный диапазон ( $r = 0,47$ ,  $p < 0,05$ ) (табл. 2) что может быть обусловлена более резкими структурными нарушениями мембран эритроцитов по мере нарастания виремии.

Нарастающая вирусная нагрузка оказывает существенное влияние и на показатели поляризуемости клеток на разных частотах (табл. 3). Этот параметр отражает степени жизнеспособности клетки, её биологической активности (гемолизированные эритроциты, так называемые «тени клеток», имеют поляризуемость, равную нулю).

Относительная поляризуемость — это модуль отношения поляризуемости на частоте  $10^5$  Гц к поляризуемости на частоте  $10^6$  Гц. Она характеризует динамический диапазон величин поляризуемости, степень адаптации клетки к внешним условиям. На низких частотах ( $5 \cdot 10^4$  и  $10^5$  Гц) поляризуемость эритроцитов при невысокой нагрузке достоверно не отличалась от группы сравнения, наблюдалась лишь тенденция к снижению показателей. Высокая вирусная нагрузка приводила к высокостепенному снижению поляризуемости. На высоких частотах ( $5 \cdot 10^5$  и  $10^6$  Гц) достоверные отличия поляризуемости при ХВГВ от группы сравнения выявились уже при невысокой вирусной активности и достоверность различий увеличивалась по мере нарастания вирусной нагрузки. В группах пациентов с высокой вирусной нагрузкой выявлены обратные корреляции уровня АЛТ с показателями поляризуемости на высоких частотах (на частоте  $10^6$  Гц  $r = -0,62$ ,  $p < 0,05$ ).

По данным С.А. Шутько и соавт. [17], обнаружена прямая корреляционная зависимость между УВН и показателями активности АЛТ у пациентов с естественным течением хронической HBV-моно-

Таблица 3. Поляризуемость эритроцитов у больных с ХВГВ с различным уровнем вирусной нагрузки ( $M \pm m$ )

Показатели эритроцитов	1-я группа, сравнения (n = 27)	2-я группа, низкая вирусная нагрузка (n = 17)	3-я группа, высокая вирусная нагрузка (n = 12)
Поляризуемость, м <sup>3</sup> (частота $5 \cdot 10^4$ Гц)	$-(1,9 \pm 0,2) \cdot 10^{-15}$	$-(2,4 \pm 0,3) \cdot 10^{-15}$	$-(4,2 \pm 0,3) \cdot 10^{-15}*****$
Поляризуемость, м <sup>3</sup> (частота $10^5$ Гц)	$-(1,0 \pm 0,4) \cdot 10^{-15}$	$-(1,7 \pm 0,5) \cdot 10^{-15}$	$-(2,7 \pm 0,4) \cdot 10^{-15}***^*$
Поляризуемость, м <sup>3</sup> (частота $5 \cdot 10^5$ Гц)	$(5,7 \pm 0,7) \cdot 10^{-15}$	$(4,5 \pm 0,5) \cdot 10^{-15}$	$(3,2 \pm 0,4) \cdot 10^{-15}***^*$
Поляризуемость, м <sup>3</sup> (частота $10^6$ Гц)	$(9,1 \pm 0,2) \cdot 10^{-15}$	$(7,7 \pm 0,6) \cdot 10^{-15}*$	$(5,2 \pm 0,4) \cdot 10^{-15}*****$
Относительная поляризуемость	$0,41 \pm 0,02$	$0,22 \pm 0,09$	$0,52 \pm 0,09*****$

Примечание. М — средняя арифметическая вариационного ряда, m — средняя ошибка средней арифметической [11]. \* — статистическая значимость отличия от 1-й группы (\* —  $p < 0,05$ , \*\* —  $p < 0,01$ , \*\*\* —  $p < 0,001$ ); ^ — статистическая значимость отличия от 2-й группы (^ —  $p < 0,05$ , ^^ —  $p < 0,02$ , \*\*\* —  $p < 0,001$ ).

инфекции. Таким образом, сниженные показатели поляризуемости эритроцитов при высокой вирусной нагрузке отражают снижение резистентности мембран гепатоцитов, ассоциированное с повышением активности АЛТ, отражающим нарастание цитолиза.

Относительная поляризуемость продемонстрировала максимальные значения при высокой вирусной нагрузке, что отражает усиление дезадаптации клеток красной крови по мере нарастания вирусной активности. Сниженная поляризуемость эритроцитов на различных частотах при вирусных гепатитах отражает также сниженную резистентность клеток в условиях действия стресса различной интенсивности. Она может быть генетически детерминирована, что предполагает сбой в костномозговом синтезе какого-либо из белков, фосфолипидов эритроцитов или синтез его альтернативными путями. При ХВГВ сниженная резистентность эритроцитов является приобретённой, когда под воздействием вируса происходит хроническое раздражение красного кровяного ростка, в ходе чего происходит активация ускоренного, недостаточно «эффективного» эритропоэза. Эритроциты в этом случае проходят не 10 стадий созревания, а только 5 или 7 с выбросом на периферию неполноценных клеток с мембранами, имеющими изменённый состав поверхностных структур, в частности, с высоким уровнем карбоксильных групп. Изменённая поверхностная структура воспринимается иммунокомпетентными клетками как подлежащая извлечению из кровотока. Поэтому подобные клетки являются «короткоживущими», со склонностью к повышенному лизису [10, 12].

Генез апластической анемии, иногда развивающейся при ХВГВ, связывают с супрессорным влиянием HBV на эритропоэз. Анемия и тромбоцитопения, наряду с гиперспленизмом, могут быть обусловлены геморрагическим синдромом, нередко регистрируемым при хронических гепатитах, в частности, вызванных HBV. Они связаны с угнетением белоксинтезирующей функции печени, в частности уменьшением выработки факторов свертывания крови, прежде всего прокоагулянтов (протромбин, проконвертин, проакцелерин). Развивающаяся анемия имеет апластический характер, что подтверждается невысокими показателями содержания ретикулоцитов [22].

При хроническом гепатите В патологию системы крови связывают также с репликацией и последующей интеграцией вируса в клетки костного мозга, лимфатических узлов и селезёнки [8, 14]. Подобными воздействиями вируса, вероятно, объясняются существенные сдвиги в структуре эритроцитов при патологии печени вирусного генеза. Внепечёночная репликация HBV доказана, в частности, в мононуклеарах крови.

Таким образом, при ХВГВ эритроциты имели признаки сниженной жизнеспособности с явлениями энергетического дефицита в виде значительно сниженной поляризуемости на всех частотах, ёмкости мембран (что отражает уменьшение их толщины со снижением поверхностного электрического заряда), смещения равновесной частоты в высокочастотную область. Следствием этого было снижение резистентности эритроцитов, которое приводило к лёгкому разрушению клеток при стрессах различной интенсивности (в данном случае, моделью этого являлось использование различных частот электрического поля и наблюдаемый при этом лизис клеток). Отсюда высокие уровни индекса деструкции на всех частотах и высокие уровни индекса агрегации, поскольку высвобождающийся при разрушении эритроцитов АДФ является мощным индуктором образования агрегатов, в том числе и лейкоцитарно-тромбоцитарных [10].

Нарастание вирусной нагрузки сопряжено с увеличением уровня гемолиза клеток. Причём у пациентов с низкой вирусной нагрузкой отмечен умеренный лизис лишь на высоких частотах ( $5 \cdot 10^5$ ,  $10^6$  Гц). Высокая вирусная активность ассоциирована со значительно повышенным гемолизом на всех частотах исследуемого диапазона ( $p < 0,001-0,05$ ). Установлена прямая корреляция степени гемолиза эритроцитов на высоких частотах с уровнем непрямого билирубина ( $r = 0,57$ ,  $p < 0,04$ ).

Сниженная поляризуемость, особенно на частоте  $10^6$  Гц, отражающая уменьшение физиологической активности эритроцитов, оказалась обратно связанной с индексом деструкции клеток под действием НПЭП ( $r = -0,61$ ,  $p < 0,02$ ).

Отдельный интерес представили 3 пациента с очень высоким уровнем виремии — более  $10^{6-7}$  копий/мл (все они оказались HBe-Ag-позитивными). Поведение эритроцитов отличалось по ряду параметров на порядок от вышеописанных. Так, у 2-х пациентов наблюдалось крайне резкое смещение равновесной частоты в высокочастотный диапазон — область более  $10^7$  Гц, резкое утолщение мембран — электрическая ёмкость клеток  $(4,7 \pm 0,6) \cdot 10^{16}$  Ф, значительное увеличение электропроводности  $(2,7 \pm 0,7) \cdot 10^{-4}$  См/м, обилие агрегатов крупных и гигантских (индекс агрегации  $0,88 \pm 0,12$  усл. ед., «липкие» клетки, низкая поляризуемость на всех частотах (1 МГц —  $(1,3 \pm 0,4) \cdot 10^{-15}$ ; 0,5 МГц —  $(0,5 \pm 0,1) \cdot 10^{-15}$ ; 0,1 МГц —  $(1,9 \pm 0,6) \cdot 10^{-16}$ ; 0,05 МГц —  $(5,1 \pm 0,7) \cdot 10^{-16}$  м<sup>3</sup>), выраженный гемолиз на всех частотах (индекс деструкции составил  $10,3 \pm 1,4\%$ ).

У 3-го больного выявлен второй вариант: резкое смещение равновесной частоты в низкочастотный диапазон — менее  $10^4$  МГц, резкое истончение мембран эритроцитов — электрическая ёмкость клеток

составила  $3,4 \cdot 10^{15}$  Ф, снижение электропроводности  $1,7 \cdot 10^{-5}$  См/м в сочетании с низкими уровнями поляризуемости, приводящими к избыточному гемолизу и агрегатообразованию. Вероятно, наблюдаемые сдвиги являются результатом резкого раздражения красного ростка крови с активацией ускоренного малоэффективного эритропоэза.

Таким образом, в результате исследования установлено, что нарастание вирусной нагрузки приводит к деполаризации эритроцитов, при этом амплитудно-частотные характеристики поляризации клетки в НПЭП являются хорошим индикатором физико-химических свойств её мембраны и цитоплазмы, а также отражают состояние её биологической активности.

## Заключение

У пациентов с ХВГВ обобщённые показатели жёсткости, вязкости, электрическая проводимость клеток, индексы агрегации, деструкции эритроцитов, относительная поляризуемость достоверно увеличивались, а поляризуемость на всех частотах, скорость движения клеток к электродам, электрическая ёмкость мембран эритроцитов снижались по мере нарастания вирусной нагрузки.

Резкое изменение параметров эритроцитов у пациентов с очень высоким уровнем вирусной нагрузки, вероятно, отражает выраженную степень дезадаптации клеток красной крови.

Установлены корреляции электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов с биохимическими показателями: индекса агрегации, скорости движения эритроцитов — с уровнем фибриногена, электрической ёмкости клеток — со степенью диспротеинемии, поляризуемости на высоких частотах — с уровнем активности АЛТ, индекса деструкции — с уровнем непрямого билирубина. Выявлена связь положения равновесной частоты с уровнем виремии.

Полученные данные позволяют дополнить представления о патогенезе системных проявлений вирусного гепатита В и ассоциаций высокой вирусной нагрузки со значимым изменением ряда вязкоэластических и электрических свойств эритроцитов.

## Список литературы

1. Бююль А., Цефель П. SPSS: искусство обработки информации. Анализ статистических данных и восстановление скрытых закономерностей. Пер. с нем. СПб.: ДиаСофтЮП, 2002. 608 с.

2. Генералов В.М., Бакиров Т.С., Дурыманов А.Г. и др. Исследование вирус-клеточного взаимодействия методом диэлектрофореза // Доклады академии наук. 2002. Т. 383, № 2. С. 256–259.
3. Генералов В.М., Кручинина М.В., Дурыманов А.Г., Медведев А.А., Сафатов А.С., Сергеев А.Н., Буряк Г.А., Курилович С.А., Громов А.А. Диэлектрофорез в диагностике инфекционных и неинфекционных заболеваний. Новосибирск: ЦЭРИС, 2011. 172 с.
4. Геннис Р. Биомембраны: Молекулярная структура и функции. М.: Мир, 1997. 624 с.
5. Зубаиров Д.М. Молекулярные основы свёртывания крови и тромбообразования. Казань: Фэн, 2000. 364 с.
6. Ивашкин В.Т. Иммунная система и повреждения печени при хронических гепатитах В и С // РЖГГК. 2009. Т. 19, № 6. С. 4–10.
7. Ивашкин Н.Т. Болезни печени и желчевыводящих путей. Руководство для врачей. Москва: М-Вести, 2002. 387 с.
8. Калинин А.В. и др. Гастроэнтерология и гепатология: диагностика и лечение. Москва: Миклош, 2006. 602 с.
9. Кишкун А.А. Руководство по лабораторным методам диагностики. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. 800 с.
10. Козинец Г.И., Макарова В.А. Исследование системы крови в клинической практике. М: Триада-Х, 1997. 480 с.
11. Левтов В.А., Регирер С.А., Шадрина Н.Х. Реология крови. М.: Медицина, 1982. 271 с.
12. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А. Физиология и патофизиология эритроцита. Томск: Издательство ТГУ, 2004. 202 с.
13. Подымова С.Д. Болезни печени. М.: Медицина, 1993. 544 с.
14. Соринсон С.Н. Вирусные гепатиты. СПб.: ТЕЗА, 1998. 325 с.
15. Трещинский А.И., Мищук И.И. Электрокинетические свойства крови // Анестезиология и реаниматология. 1981. № 4. С. 17–21.
16. Харамоненко С.С., Ракитанская А.А. Электрофорез клеток крови в норме и патологии. Минск: Беларусь, 1974. 144 с.
17. Шутько С.А., Дудина К.Р., Знойко О.О., Климова Е.А., Каширин В.И., Чешик Д.С., Юшук Н.Д. Клиническое значение динамического определения уровня вирусной нагрузки в крови у пациентов с естественным течением хронической HBV-моноинфекции // РЖГГК. 2009. Т. 19, № 6. С. 28–33.
18. Agalar C., Diri C., Ucbutum S. The role of HBV DNA and liver histopathology in HBsAg carriers // Hepatogastroenterology. 1997. Vol. 44, № 16. P. 1196–1199.
19. Chen C.J., Yang H.I., Su J. et al. Predicting cirrhosis risk based on the level of circulating hepatitis B viral load // Gastroenterology. 2006. Vol. 130, № 3. P. 678–686.
20. Chen C.J., Yang H.I., Su J. et al. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level // JAMA. 2006. Vol. 295, № 1. P. 65–73.
21. Emmet B., Douglas T. A treatment algorithm for the management of chronic HBV infection in the U.S. // Clin. Gastroenterol. Hepatol. 2004. Vol. 2, № 2. P. 87–106.
22. Sherlock S., Dooley J. Diseases of the liver and biliary system, 10th ed. / London: Blackwell Science Ltd. 1997. 327 p.

Исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, соглашение 8041 от 24.08.2012, номер заявки «2012-11-12-000-1001-004».

Авторы заявляют, что данная работа, её тема, предмет и содержание не затрагивают конкурирующих интересов.