

Паруликова Марина Владимировна

КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА,
ОСОБЕННОСТИ ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ, ВЯЗКОУПРУГИХ ПАРАМЕТРОВ
ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ЖИРОВОЙ БОЛЕЗНИ ПЕЧЕНИ

3.1.18. Внутренние болезни

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата медицинских наук

Новосибирск

2025

Диссертационная работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»

Научно-исследовательском институте терапии и профилактической медицины – филиале Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН)

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор Кручинина Маргарита Витальевна

Официальные оппоненты:

Маевская Марина Викторовна, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации, врач-гастроэнтеролог ЛДО №3 с функциями приемного отделения УКБ №2, вице-президент Российского общества по изучению печени

Ливзан Мария Анатольевна, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ректор, заведующий кафедрой факультетской терапии и гастроэнтерологии.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «27» июня 2025 г. в 14.00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.239.02 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» по адресу: 630089, г. Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, д. 175/1, тел. 8 (383) 264-25-16.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН (630089, г. Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, д. 175/1, <https://iimed.ru>).

Автореферат разослан «_____» _____ 2025 года.

Ученый секретарь Диссертационного совета,

доктор медицинских наук С. В. Мустафина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Жировая болезнь печени (ЖБП) является распространенным заболеванием с тенденцией к дальнейшему росту (Cotter T.G. et al., 2020; Paik J.M. et al., 2020; Mitra S. et al., 2020; Маевская М.В. и соавт., 2022; Маев И.В. и соавт., 2023). Значимость данной патологии определяется ее возможным прогрессированием до цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы и влиянием на смертность от других причин (сердечно-сосудистая патология, сахарный диабет, хроническая болезнь почек и др.) (Polyzos S.A. et al., 2023; Le M.H. et al., 2024; Mantovani A. et al., 2022; Lee C.H. et al., 2022).

В 2023 г. был предложен термин «Steatotic liver disease» (SLD) (стеатотическая или стеатозная болезнь печени), который является «зонтичным» и охватывает заболевания с различным генезом развития стеатоза (кардиометаболический, алкогольный, вирусный, лекарственный, моногенные заболевания и другие). В соответствии с новой классификацией неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП), или стеатотическая болезнь печени, ассоциированная с метаболической дисфункцией, «metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease» (MASLD), верифицируется при наличии стеатоза печени в сочетании по меньшей мере с одним кардиометаболическим фактором риска при отсутствии другой явной причины. Жировая болезнь печени смешанного генеза (MetALD) – это сочетание MASLD с алкогольной болезнью печени (alcoholic liver disease ALD) для категории пациентов с потреблением алкоголя больше, чем возможно для НАЖБП (140/210 г и более чистого этанола в неделю для женщин и мужчин, соответственно). Алкогольная болезнь печени (АБП) диагностируется при потреблении алкогольных напитков в пересчете на чистый этанол в дозах равных или более 50 г в день и 350 г в неделю для женщин, 60 г в день и 420 г в неделю для мужчин (Rinella M.E. et al., 2023). Показаны более высокие темпы прогрессирования фиброза с развитием цирроза печени, гепатоцеллюлярной карциномы, невропатии, энцефалопатии, повышение риска развития злокачественных новообразований при алкогольной жировой болезни печени (АЖБП) (Singal A.K. et al., 2018), более высокая смертность от сердечно-сосудистых, цереброваскулярных событий при НАЖБП (Paik J.M. et al., 2020; Targher G., 2020). Наличие двух этиологических факторов предполагает потенцирующее их действие как на прогрессирование диффузной патологии печени, так и на смертность от других причин (Younossi M. et al., 2016). Дифференциальный диагноз между различными нозологическими формами ЖБП основывается преимущественно на анамнестических данных, данных опросников CAGE, AUDIT (Ивашкин В.Т. и др., 2022; АБП у взрослых. Клин. рек., 2022). В клинической практике достаточно сложно установить факт систематического потребления токсических доз этанола, при этом нет прямой корреляции между развитием алкогольной зависимости, степенью алкоголизации и наличием, тяжестью поражения печени (Singal A.K. et al., 2018; Arab P. et al., 2019). Требуется дополнительные методы исследования, которые могут быть полезными при проведении дифференциальной диагностики между НАЖБП и АЖБП.

Гистологический спектр ЖБП включает в себя как простой стеатоз, зачастую с доброкачественным течением, так и стеатогепатит, форму с гораздо большим риском прогрессирования в фатальные исходы, такие как цирроз печени, гепатоцеллюлярная карцинома и необходимостью трансплантации печени (Polyzos S.A. et al., 2023), с высокой частотой сердечно-сосудистой смертности независимо от традиционных факторов риска (Le M.H. et al., 2024), риском развития сахарного диабета 2 типа (Lee C.H. et al., 2022), с более высокой распространенностью и частотой развития хронической болезни почек (Mantovani A. et al., 2022). Несмотря на быстро растущую распространенность стеатоза и стеатогепатита, в настоящее время не существует эффективной фармакотерапии этого заболевания. Раннее выявление лиц из группы высокого риска с последующим изменением образа жизни остается оптимальной стратегией.

«Золотым стандартом» для установления диагноза «стеатогепатит» является гистологическая оценка при проведении биопсии печени (EASL Clinical Practice Guidelines on non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis, 2021), для выполнения которой необходимы

показания, часто отсутствующие у основной категории пациентов с ЖБП. Кроме того, метод имеет перечень недостатков, в том числе инвазивность, ошибки взятия образца, потребность в специальном оборудовании, реактивах, необходимость в госпитализации, потенциальный риск развития осложнений и различия в интерпретации гистологической картины патоморфологами (Takahashi Y. et al, 2023).

Имеющиеся в распоряжении методы визуализации, такие как эхография печени, САР-функция при выполнении эластографии печени, компьютерная томография, магнитно-резонансная спектроскопия, не позволяют четко дифференцировать стеатоз от стеатогепатита (Chalasanani N. et al., 2018).

Доступная в клинической практике активность аминотрансфераз в качестве показателя воспаления не всегда информативна, так как у 13–27 % пациентов со стеатогепатитом значения АЛТ находятся в пределах референтных значений (Uslusoy H.S. et al, 2009). Для выявления стеатогепатита имеется перечень сывороточных тестов, предполагающих определение ряда биохимических показателей с использованием специальных алгоритмов: ActiTest в составе FibroTest; NashTest и AshTest в составе FibroMax с ограничениями по точности в связи с включением в модели параметров биохимии (Chen Z. et al, 2022).

Проблема поиска малоинвазивных чувствительных маркеров, позволяющих различить алкогольный и неалкогольный генез ЖБП, оценить активность заболевания, остается актуальной (Райхельсон К.Л. и др., 2024). Проведенные ранее работы продемонстрировали перспективность использования структурно-функциональных показателей клеток красной крови с этой целью, принимая во внимание высокую чувствительность эритроцитов к воздействию метаболических факторов и этанола (Новицкий В.В. и др., 2004; Mohandas N. et al., 2008; Hon G. et al., 2009; Jauregibeitia I. et al., 2021; Генералов К.В. и др., 2024). Использование электрических, вязкоупругих характеристик эритроцитов в качестве показателей, различающих жировую болезнь печени различного генеза, и применение их для выявления стеатогепатита в предшествующих исследованиях не отмечено. Актуальность ранней диагностики ЖБП у пациентов без выраженного фиброза определяется обратимостью изменений в ткани печени при полном воздержании от алкоголя при АЖБП и изменении образа жизни при НАЖБП.

Степень разработанности темы исследования

Имеющиеся методы – УЗИ исследование, компьютерная томография, магнитно-резонансная томография, САР-функция при выполнении эластометрии печени, сывороточные тесты (StestoTest), индексы NAFLD liver fat score, индекс стеатоза Stindex и др. позволяют установить факт наличия стеатоза печени или его риск, степень (Ивашкин В.Т. и др., 2022), но не дают возможности различить алкогольный и неалкогольный генез жировой болезни печени. Данные опросников «CAGE», «AUDIT» позволяют заподозрить алкогольное поражение печени (Bradley K.A. et al., 2003). Прямые (этиловые эфиры жирных кислот, фосфатидилэтанол, этилглюкуронид, этилсульфат) и непрямые (карбогидрат-дефицитный трансферрин, средний корпускулярный объем эритроцитов - СКОЭ, активность трансаминаз, ГГТП и др.) имеют ограничения, связанные с количеством потребляемого этанола, в ряде случаев показывают невысокую чувствительность и специфичность (Маевская М.В. и др., 2016; EASL Clinical Practical Guidelines: Management of Alcoholic Liver Disease, 2018; Thursz, Mark et al., 2018). Большая часть биомаркеров ассоциирована с фактом потребления алкоголя, что не эквивалентно наличию алкогольного поражения печени. Верификация диагноза «стеатогепатит» предполагает выполнение биопсии печени с ограничениями ее использования в связи с инвазивностью, риском осложнений. Использование сывороточных тестов ActiTest, NashTest, AshTest для определения степени некровоспалительной активности в ткани печени возможно лишь при наличии исходной информации об этиологии заболевания и с учетом воспаления в других органах (Bril F. et al., 2019).

В литературе имеются данные о возможности использования ряда параметров эритроцитов для определения риска развития, прогноза пациентов с жировой болезнью печени. Показана

положительная корреляция между риском жировой дистрофии печени и количеством эритроцитов (Wang H.L. et al., 2017). Уровень гемоглобина в сочетании с триглицеридами и ферритином рассмотрен как индикатор прогнозирования НАЖБП, сопоставимый с индексом жировой болезни печени (Jiang Y. et al., 2014). Выявлены корреляции повышенной ширины распределения эритроцитов по объему (RDW) у пациентов с НАЖБП с наличием стеатогепатита, фиброза (Cengiz M. et al., 2013; Kim H.M. et al., 2013). Увеличенный СКОЭ, появление аномального фосфолипида в мембранах клеток (фосфатидилэтанола) (Bartel M. et al., 2023; Helander A. et al., 2019; Reisfield G.M. et al., 2020), повышенный уровень эхиноцитов, стоматоцитов, триангулоцитов или шпоровидных клеток (Lee S.Y. et al., 2015), этиловые эфиры жирных кислот, измененный жирнокислотный состав мембран эритроцитов с накоплением очень длинноцепочечных жирных кислот (Harris J.C. et al., 2021), снижение деформируемости эритроцитов (Palmieri V.O. et al., 2006; Rabai M. et al., 2014), повышенные уровни аддуктов ацетальдегида, связанного с гемоглобином, избыточный гемолиз эритроцитов (Bulle S. et al., 2017; Mueller S. et al., 2023) предложены как возможные биомаркеры систематического потребления этанола, алкогольного поражения печени.

Цель исследования: изучить клинико-лабораторные особенности пациентов с жировой болезнью печени различного генеза, возможности использования структурно-функциональных параметров эритроцитов для дифференциальной диагностики начальных стадий жировой болезни печени различного генеза (неалкогольный, алкогольный, смешанный – метаболический + алкогольный) и степени некровоспалительной активности.

Задачи исследования:

1. Изучить клинико-лабораторные особенности пациентов с начальными стадиями жировой болезни печени различного генеза, исследовать методом диэлектрофореза и сравнить электрические и вязкоупругие параметры эритроцитов у пациентов с жировой болезнью печени различного генеза (неалкогольный, алкогольный, смешанный – метаболический + алкогольный) и у лиц группы сравнения.

2. Выявить наиболее значимые комплексы показателей эритроцитов и их динамику под влиянием этанола в эксперименте *in vitro* для дифференциальной диагностики между жировой болезнью печени алкогольного и неалкогольного генеза.

3. Установить совокупность вязкоупругих, электрических характеристик эритроцитов, значимых для различения стеатоза и стеатогепатита при жировой болезни печени.

4. Изучить особенности электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов у пациентов с жировой болезнью печени в динамике абстинентного синдрома при алкогольной и снижения массы тела при неалкогольной жировой болезни печени.

Научная новизна

Впервые при комплексном исследовании свойств эритроцитов установлено, что эритроциты пациентов с алкогольным и смешанным генезом начальных стадий жировой болезни печени имели наибольшие отклонения от показателей у лиц группы сравнения и у пациентов с жировой болезнью печени неалкогольного генеза: при систематическом потреблении токсических доз этанола клетки красной крови отличались большей степенью морфологических изменений; сниженной деформируемостью, более высокими уровнями обобщенных показателей вязкости, жесткости; более низкой емкостью и повышенной электропроводностью мембран; сниженным поверхностным зарядом (отражаемым скоростью движения клеток к электродам и дипольным моментом), ассоциированным с образованием агрегатов; меньшей резистентностью клеток с большей готовностью к гемолизу на низких и высоких частотах электрического поля ($p < 0,0001-0,05$).

Впервые установлены электрические, вязкоупругие показатели клеток красной крови, являющиеся биомаркерами для различения алкогольной и неалкогольной жировой болезни печени: емкость клеточной мембраны ($p < 0,0001$); степень изменения амплитуды деформации

эритроцитов на частоте $0,5 \times 10^6$ Гц ($p < 0,0001$); поляризуемость клеток на частоте 10^6 Гц ($p < 0,0001$); скорость движения клеток к электродам ($p < 0,0001$); величина дипольного момента ($p < 0,0001$); относительная поляризуемость ($p < 0,0001$); индекс деструкции эритроцитов на частоте $0,5 \times 10^6$ Гц ($p = 0,016$); положение равновесной частоты ($p < 0,0001$) (диагностическая точность модели – AUC 0,975 с чувствительностью 96,3 %, специфичностью 91,8 % при дифференцировании АЖБП и НАЖБП).

Впервые выявлены показатели эритроцитов, наиболее значимые для дифференцирования жировой болезни печени смешанного генеза (метаболический + алкогольный) от неалкогольной жировой болезни печени – степень деформации эритроцитов на частоте $0,5 \times 10^6$ Гц, поляризуемость клеток на частоте 10^6 Гц и емкость мембран (AUC 0,829 (ДИ 0,742–0,916), чувствительность 80,9 %, специфичность 83,3 %).

Впервые создана комплексная «панель», состоящая из трех показателей эритроцитов – индекса деструкции на частоте $0,5 \times 10^6$ Гц, поляризуемости на частоте 10^6 Гц, емкости мембран клеток для различения ЖБП смешанного генеза от АЖБП. Уровень диагностической точности модель оказался наибольшим – AUC 0,751 (ДИ 0,611–0,908) с чувствительностью 79,5 %, специфичностью 74,7 %.

Впервые предложен и оформлен в виде патента экспресс-метод для различения алкогольного и неалкогольного генеза жировой болезни печени, основанный на противоположном эффекте кратковременной экспозиции эритроцитов *in vitro* с физиологическими низкими дозами раствора этанола: увеличение амплитуды деформации и снижение обобщенных показателей вязкости, жесткости при АЖБП и инверсный эффект – при НАЖБП ($p = 0,01–0,05$). Чувствительность способа – 87,5 %, специфичность – 96,2 %, прогностическая ценность положительного – 95,4 % и отрицательного результата метода – 89,3 %, индекс точности 92 %.

Впервые определены вязкоупругие, электрические параметры эритроцитов, позволяющие различить стеатогепатит от стеатоза печени – более низкие уровни амплитуды деформации на частоте 10^6 Гц ($p = 0,0003$), дипольного момента ($p = 0,009$), емкости мембран ($p = 0,014$), поляризуемости эритроцитов на высокой частоте 10^6 Гц ($p = 0,03$) и более высокие значения электропроводности мембран клеток ($p = 0,008$), обобщенных вязкости ($p = 0,006$), жесткости ($p = 0,005$). Впервые построена диагностическая модель для дифференцирования стеатогепатита от стеатоза с AUC 0,904, чувствительностью 0,9, специфичностью 0,83.

Впервые выявлены изменения электрических, вязкоупругих параметров эритроцитов в динамике абстинентного синдрома у пациентов с АЖБП в течение 3-х месяцев. Изменение ряда параметров эритроцитов – емкости клеток, электропроводности, положения равновесной частоты, поляризуемости на частоте 10^6 Гц, скорости движения к электродам, величины дипольного момента – происходили в более ранние сроки абстиненции – к концу первого месяца. Амплитуда деформации, обобщенные показатели вязкости, жесткости, индексы деструкции на разных частотах электрического поля, агрегации продемонстрировали положительные сдвиги в более отдаленный период – к концу третьего месяца ($p = 0,004–0,02$). У пациентов с НАЖБП на фоне снижения массы тела на 5–7 % от исходной отмечены тенденции к изменению ограниченного числа параметров (амплитуда деформации, индексы деструкции на разных частотах, величина дипольного момента), не достигающие уровня достоверности.

Теоретическая и практическая значимость работы

Использование различных сочетаний наиболее значимых вязкоупругих, электрических показателей эритроцитов, ассоциированных с разной этиологией при начальных стадиях жировой болезни печени, степенью некровоспалительной активности, может быть дополнительным средством при проведении дифференциальной диагностики неалкогольного, алкогольного, смешанного генеза патологии печени, в различении стеатогепатита от стеатоза. Данный подход обеспечит более короткие сроки верификации диагноза, повысит его достоверность у пациентов с жировой болезнью печени.

Предложенный экспресс-метод установления наиболее вероятного генеза жировой болезни печени (неалкогольный или алкогольный) может использоваться при проведении скрининговых исследований и оптимизирует тактику ведения пациентов в клинической практике. Потенциально данный подход может быть полезным при оценке состояния лиц, профессия которых предполагает использование транспортных средств с повышенным уровнем опасности, диспетчеров и др.

Информация о скорости изменения электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов в динамике абстиненции обеспечит получение объективных данных о воздержании от алкоголя, особенно при нормальных уровнях активности трансаминаз. Подтверждение абстиненции важно для назначения ряда препаратов (противовирусных, цитостатических, гормональных и др.), для планирования трансплантации печени.

Методология и методы исследования

Дизайн настоящего исследования предполагал изучение «серии случаев» с фрагментом проспективного наблюдения. В период с 2017 по 2023 годы были обследованы и пролечены 206 пациентов – мужчин с жировой болезнью печени различного генеза (неалкогольный, алкогольный, смешанный – метаболический + алкогольный), включенных в настоящее исследование. Пациентам проведено комплексное обследование, включая общеклиническое, клинико-инструментальное; осуществлялся забор крови для проведения биохимических, лабораторных анализов, в том числе для изучения электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов. В процессе выполнения обследования у 70 пациентов была верифицирована НАЖБП, у 69 – АЖБП, у 67 лиц диагностирована ЖБП смешанного генеза (метаболический + алкогольный). У части пациентов: 22 мужчины с НАЖБП и 24 – с АЖБП – осуществлено динамическое наблюдение на протяжении 3 месяцев снижения массы тела и абстинентного синдрома. Группа сравнения состояла из 56 мужчин, придерживающихся здорового образа жизни, сопоставимых по возрасту с пациентами с ЖБП. Мужчины группы сравнения не потребляли алкогольные напитки вообще или потребляли алкоголь один раз в месяц и реже в дозах не более 20 граммов в сутки в пересчете на чистый этанол. Лица группы сравнения не имели признаков жировой болезни печени, метаболического синдрома, манифестирующей патологии внутренних органов; проведение обследования на вышеуказанных клинических базах им осуществлялось с профилактической целью. Обследование лиц группы сравнения проведено по такому же протоколу, что и для пациентов с жировой болезнью печени.

Проведение исследования одобрено ЛЭК НИИТПМ – филиала ИЦиГ СОРАН (29.11.2016, протокол № 122).

Полученные данные были проанализированы с использованием комплекса современных методов статистического анализа, включая машинное обучение, что обеспечило получение достоверных результатов и позволило сформулировать обоснованные выводы.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. У пациентов с жировой болезнью печени начальных стадий по сравнению с лицами контрольной группы выявлены особенности электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов, ассоциированные с генезом заболевания – алкогольный, неалкогольный, смешанный (метаболический + алкогольный) и степенью некровоспалительной активности.

2. Предложенный экспресс-метод установления алкогольного и неалкогольного генеза жировой болезни печени на основании инверсного изменения при диэлектрофорезе эритроцитов уровней амплитуды их деформации, обобщенных показателей вязкости, жесткости в эксперименте *in vitro* с добавлением этанола обладает высокой диагностической точностью. Метод патогенетически обоснован разной реакцией клеток на токсический агент в зависимости от наличия или отсутствия адаптации к его систематическому воздействию.

3. Динамика электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов при воздержании от алкоголя у пациентов с алкогольной жировой болезнью печени и снижении массы тела у пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени различается в зависимости от этиологического фактора жировой болезни печени, демонстрируя большую скорость положительных сдвигов при отказе от алкоголя и большую ригидность изменений показателей эритроцитов при воздействии метаболических факторов.

Степень достоверности результатов исследования

Мощность выборки рассчитывалась при помощи специальной формулы:

$$N_{\min} = 15,4 * (p * (1 - p)) / W^2. \quad (1)$$

где p – ожидаемое значение вероятности случайного события; W – ширина доверительного интервала для значения вероятности. Минимальный объем достаточной выборки пациентов составил 203 пациента.

Достоверность результатов и выводов диссертационной работы базируется на использовании современных критериев верификации диагноза, клиническо-диагностических, лабораторных методик в соответствии с Российскими клиническими рекомендациями последних пересмотров. Статистическая обработка полученных данных проводилась с применением программного обеспечения MATLAB (R2019a, MathWorks) и языка программирования R (включая пакет программ IBM SPSS Statistics (версия 26.0), методов машинного обучения (Random Forest) с использованием стандартных библиотек обучающих классификаций и наборов инструментов статистики.

Апробация результатов исследования

Результаты работы представлены и обсуждены автором на: объединенных Российских Гастроэнтерологических неделях (Москва, 2017-2024 гг.), доклады получали первые премии в конкурсах стендовых докладов; Международных медицинских Славяно-Балтийских научных форумах «Санкт-Петербург – Гастро-2017-2019», XVII, XXI Съездах Научного общества гастроэнтерологов России (НОГР) (Санкт-Петербург, 2017-2019 гг.); на объединенных Европейских виртуальных Гастроэнтерологических неделях (2020-2022 гг.); на 2-м Глобальном Саммите по диабету и эндокринологии (Валенсия, Испания, 2018).

Апробация диссертационной работы проведена на межлабораторном семинаре НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН 17 декабря 2024 г.

Публикации результатов исследования

Материалы диссертационного исследования в полном объеме отражены в опубликованных автором работах. По теме диссертации опубликовано десять научных работ: семь статей в российских журналах, рекомендованных Перечнем Высшей аттестационной комиссии Российской Федерации, из них четыре статьи в журналах, входящих в международную реферативную базу данных и систем цитирования (Web of Science и/или Scopus), главы в монографии, свидетельство о государственной регистрации базы данных, патент на изобретение.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа представлена на 228 страницах машинописного текста, иллюстрирована 19 таблицами и 23 рисунками.

Текст диссертации включает разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственных исследований, обсуждение полученных результатов, заключение, выводы, практические рекомендации, список используемой литературы, приложения. Список цитируемой литературы включает 292 источника, в том числе 44 российских и 248 зарубежных.

Личный вклад автора

Автором лично сформированы основная и контрольная группы обследованных, проведено клиническое обследование пациентов, выполнена подготовка образцов для исследования электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов, создана база данных на основании данных анкет, опросников, полученных результатов, при консультировании специалистов по статистической обработке произведен анализ полученного материала, осуществлена научная интерпретация полученных результатов. В соавторстве с Кручининой М.В., Осипенко М.Ф. с большей долей вклада диссертанта на каждом этапе были написаны и опубликованы статьи в журналах, включенных в Перечень рекомендованных ВАК, в которых отражены полученные результаты, создан патент на изобретение, зарегистрирована база данных по пациентам с жировой болезнью печени, напечатаны главы коллективной монографии «Диэлектрофорез в медицине».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дизайн исследования – «серия случаев» с фрагментом проспективного исследования (рисунок 1). Обследование пациентов на базе гастроэнтерологического отделения ЧУЗ «Клиническая больница «РЖД-Медицина» г. Новосибирск» проведено в соответствии с условиями договора о научно-техническом сотрудничестве (от 10.01.2017), а также осуществлялось на базе консультативно-диагностического отделения НИИТПМ – филиала ИЦиГ СО РАН в период с 2017 по 2023 годы.

Критерии включения в исследование: мужской пол; возраст от 25 до 65 лет; верифицированный, согласно общепринятым критериям, диагноз «жировая болезнь печени» по данным ультразвукового исследования органов брюшной полости, подтвержденным индексом стеатоза печени FLI (Fatty liver index); степень фиброза печени по данным непрямой эластометрии не превышающая 1 степени; воздержание от приема алкоголя в течение 7–10 дней; подписание информированного согласия на участие в исследовании.

Критерии исключения: женский пол; возраст моложе 25 и старше 65 лет; жировая болезнь печени на фоне вирусных, лекарственных, аутоиммунных, генетически детерминированных патологий печени, парентерального питания; прием добавок омега-3 полиненасыщенных жирных кислот или статинов; дислипидемия, которая могла потребовать лекарственной коррекции; значительные отклонения по данным исследования общего анализа крови или биохимии крови; ранние сроки абстиненции (менее 7–10 дней); клинически значимая тяжёлая сопутствующая



Рисунок 1. Группы обследованных

патология в острой или стадии обострения (хронические инфекционно-воспалительные заболевания, почечная недостаточность, сердечная, дыхательная недостаточность, декомпенсированная патология эндокринной системы, печеночная недостаточность); известные онкологические заболевания; отказ от подписания согласия на участие в исследовании.

Согласно приведённым критериям, в обследование включены 206 пациентов – мужчин с жировой болезнью печени в возрасте от 25 до 65 лет, средний возраст ($47,7 \pm 10,1$) года: 70 пациентов с НАЖБП, 69 – с АЖБП, 67 – с ЖБП смешанного (метаболический + алкогольный) генеза. В последующем 46 пациентов с ЖБП (НАЖБП ($n = 22$), АЖБП ($n = 24$)) были обследованы в динамике наблюдения в течение 3 месяцев снижения массы тела для больных с НАЖБП и абстинентного синдрома у пациентов с АЖБП. Эритроциты 24 пациентов с НАЖБП и 26 – с АЖБП были использованы для проведения эксперимента с раствором этанола *in vitro*. У 84 пациентов с ЖБП была определена степень некрвоспалительной активности в печени с помощью расчетных алгоритмов NashTest, AshTest в составе FibroMax, ActiTest в составе FibroTest (BioPredictive, Франция). В соответствии с данными тестов, у 44 пациентов установлена минимальная некрвоспалительная активность – A0-1 для ActiTest; N0-1 для NashTest; H0-1 для AshTest, которую рассматривали как пациентов со стеатозом печени; у 40 пациентов – выраженная активность (A2-3 для ActiTest; N2 для NashTest; H2-3 для AshTest) – пациенты со стеатогепатитом.

Электрические и вязкоупругие характеристики эритроцитов методом диэлектрофореза эритроцитов в неоднородном переменном электрическом поле (ДЭФ в НПЭП) исследованы на базе биохимической лаборатории (группа гемостаза) НИИТПМ – филиала ИЦиГ СО РАН совместно с сотрудниками из ФБУН ГНЦ ВБ Вектор Роспотребнадзора (Кольцово).

Методы исследования

1. Клинико-инструментальное обследование (данные анамнеза, физикального обследования, лабораторных, инструментальных методов в соответствии с клиническими показаниями).

Всем пациентам с ЖБП и обследуемым группы контроля выполнен общий анализ крови с использованием автоматического гематологического анализатора HTMicroCC-20 Plus (HighTechnology, Inc, США); исследованы печеночные пробы, показатели липидного профиля, маркеры воспаления.

2. У 84 пациентов с ЖБП была определена степень некрвоспалительной активности в печени с помощью расчетных алгоритмов NashTest, AshTest в составе FibroMax, ActiTest в составе FibroTest (BioPredictive, Франция).

3. Исследование электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов методом диэлектрофореза с помощью электрооптической системы детекции клеток.

Для проведения исследования электрических и вязкоупругих показателей методом диэлектрофореза кровь объемом 2 мл забирали вакутейнерами в 3,7 % цитратный буфер в соотношении 9 : 1, через 1 час 9,7–12 мкл крови вносили в 0,3 М раствор сахарозы ($pH = 7,36$) с коэффициентом k 0,9–1,1 : 29–31 и переносили суспензию исследуемых эритроцитов с концентрацией клеток $1,6–1,8 \cdot 10^5$ /мкл в измерительную кювету. Сразу после разведения эритроцитов производились измерения. В измерительной ячейке на клетки воздействовали неоднородным переменным электрическим полем со следующими параметрами: напряженность электрического поля 10^5 В/м, градиент напряженности электрического поля 10^{11} В/м², частотный диапазон $5 \cdot 10^4–10^6$ Гц. Изучение электрических и вязкоупругих характеристик эритроцитов проводили на четырех фиксированных частотах: $5 \cdot 10^4$ Гц, 10^5 Гц, $5 \cdot 10^5$ Гц и 10^6 Гц.

Оценивали средний диаметр (м), доли дискоцитов, сфероцитов, деформированных клеток (%), поляризуемость клеток на разных частотах диапазона (м³), относительную поляризуемость (соотношение величины показателя на 10^6 Гц к 10^5 Гц), обобщенные показатели жесткости (Н/м), вязкости (Па·с), электропроводность мембран (См/м), индексы деструкции (на разных частотах диапазона) (%) и агрегации (усл. ед.), амплитуду деформации эритроцитов на частоте 10^6 Гц (м),

степень деформации клеток на частоте 5×10^5 Гц (%), емкость мембран эритроцитов (Φ), скорость движения клеток к электродам (мкм/с), положение равновесной частоты (Гц), величину дипольного момента (Кл·м). Для распознавания образа клеток и компьютерной обработки данных использовали пакет программ CELLFIND.

Статистический анализ данных выполнен с использованием программы IBM SPSS Statistics (версия 26.0). При нормальном распределении результаты представлены в виде среднего значения (M) и стандартного отклонения (SD) ($M \pm SD$). Для сравнения двух нормально распределенных выборок использовался t -тест Стьюдента. При отсутствии нормального распределения вычислялись медиана (Me), 25 и 75 % процентиля ($Me [25\%; 75\%]$), статистическую значимость различий показателей оценивали с помощью непараметрических критериев (U -критерий Манна–Уитни, Краскела–Уоллиса, хи-квадрат). При сравнении показателей более чем в двух группах применена поправка Бонферрони. Во всех процедурах статистического анализа критический уровень значимости нулевой гипотезы (p) принимался равным 0,05. Номинальные данные представлены в виде относительных частот объектов исследования ($n, \%$), для оценки их различий использовался критерий χ^2 .

Связи между признаками оценивались вычислением коэффициента линейной корреляции Пирсона, для интервальных и порядковых переменных, не подчиняющихся нормальному распределению, ранговым коэффициентом корреляции Спирмена.

Для установления параметров эритроцитов, которые могут быть биомаркерами для различения этиологии заболевания, стеатогепатита от стеатоза, проведена процедура нормализации уровней показателей с использованием формулы:

$$X_{new} = (X - X_{min}) / (X_{max} - X_{min}), \quad (2)$$

где X_{new} – стандартизованное значение показателя; X – начальное значение показателя; X_{min} – минимальное значение показателя в наборе данных; X_{max} – максимальное значение показателя в наборе данных.

Выявление различий между параметрами эритроцитов, ассоциированными с разной этиологией ЖБП, степенью некровоспалительного процесса в печени, обеспечил дискриминантный анализ методом наименьших квадратов (Partial least squarys-discriminant analysis – PLS-DA). Для выявления электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов, претендующих на роль биомаркеров для различения ЖБП разного генеза, стеатогепатита от стеатоза печени использованы непарный t -тест и метод Volcano plot, кластерный анализ (K-means clustering) (система методов машинного обучения – Random Forest) с применением программного обеспечения MATLAB (R2019a, Math Works) и языка программирования R с использованием стандартных библиотек обучающих классификаций и наборов инструментов статистики (Breiman L., 2001).

Оценка диагностической точности показателей в качестве биомаркеров различения этиологии ЖБП, стеатогепатита от стеатоза произведена с помощью ROC-анализа с определением значений чувствительности и специфичности.

Статистическая обработка материала проведена под руководством доцента канд. хим. наук Шестова А.А., Медицинский факультет Перельмана, Университет Пенсильвании, Филадельфия, Пенсильвания (США), при консультировании сотрудников кафедры вычислительной техники Новосибирского государственного технического университета.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Пациенты с жировой болезнью печени различного генеза и лица контрольной группы были сопоставимы по возрасту (табл. 1). Среди обследованных пациентов с неалкогольной и жировой болезнью печени смешанного генеза преобладали лица с проявлениями метаболического синдрома, с минимальными отклонениями в уровне печеночных проб, со степенью фиброза

Таблица 1. Клиническая характеристика пациентов с жировой болезнью печени и обследуемых группы сравнения (M ± SD), Me [25%; 75%]

| Показатели | Группа контроля n = 56 (1) | Группа пациентов с АЖБП n = 69 (2) | Группа пациентов с НАЖБП n = 70 (3) | Группа пациентов со смешанным генезом ЖБП n = 67 (4) | p | |
|---|-------------------------------|--|---|---|--|---|
| Возраст, лет | 48,3 ± 11,7 | 49,1 ± 10,2 | 47,5 ± 9,9 | 48,9 ± 11,4 | > 0,05 | |
| Эластичность печени, кПа | 4,47 [3,5; 5,2] | 6,92 [5,5; 7,3] | 5,51 [4,8; 6,1] | 6,57 [5,3; 7,1] | p ₁₋₂ 0,028 | |
| Индекс стеатоза печени FLI (Fatty liver index) | 28,3 ± 6,4 | 75,5 ± 10,2 | 82,3 ± 8,9 | 88,7 ± 12,6 | p ₁₋₂ 0,0001 p ₁₋₃ 0,0001 | p ₁₋₄ 0,0001 |
| Индекс NAFLD liver fat score | -1,78 ± 0,33 | 1,23 ± 0,21 | 2,87 ± 0,47 | 2,39 ± 0,57 | p ₁₋₂ 0,00001 p ₁₋₃ 0,00001 | p ₁₋₄ 0,00001 p ₂₋₃ 0,002 |
| Систолическое артериальное давление, мм рт. ст. | 112,7 ± 9,7 | 139,3 ± 17,4 | 141,7 ± 15,9 | 146,7 ± 19,3 | p ₁₋₂ 0,0002 p ₁₋₃ 0,000017 | p ₁₋₄ 0,000002 |
| Диастолическое артериальное давление, мм рт. ст. | 72,2 ± 8,3 | 87,2 ± 12,7 | 86,4 ± 11,7 | 89,4 ± 16,5 | p ₁₋₂ 0,045 p ₁₋₃ 0,011 | p ₁₋₄ 0,009 |
| Окружность талии, см | 72,4 ± 6,3 | 79,5 ± 5,7 | 102,9 ± 11,3 | 104,7 ± 12,7 | p ₁₋₃ 0,00001 p ₁₋₄ 0,000001 | p ₂₋₃ 0,0001 p ₂₋₄ 0,000004 |
| Индекс массы тела, кг/м ² | 23,1 ± 2,1 | 24,8 ± 1,9 | 34,1 ± 5,4 | 34,9 ± 5,7 | p ₁₋₃ 0,007 p ₁₋₄ 0,0009 | p ₂₋₃ 0,053 p ₂₋₄ 0,004 |
| Содержание триглицеридов, ммоль/л | 1,1 [0,9; 1,6] | 1,9 [1,4; 2,3] | 2,0 [1,5; 2,4] | 2,2 [1,6; 3,2] | p ₁₋₂ 0,028 p ₁₋₃ 0,0004 | p ₁₋₄ 0,00001 p ₂₋₄ 0,04 |
| Содержание общего холестерина, ммоль/л | 4,8 [4,1; 5,3] | 5,1 [4,6; 5,6] | 5,8 [5,5; 6,4] | 6,2 [5,6; 6,7] | p ₁₋₃ 0,000001 p ₁₋₄ 0,000001 | p ₂₋₃ 0,015 p ₂₋₄ 0,006 |
| Содержание ХС ЛПВП, ммоль/л | 1,3 [1,0; 1,5] | 1,2 [1,0; 1,3] | 1,0 [0,8; 1,1] | 1,1 [0,9; 1,2] | p ₁₋₃ 0,048 p ₁₋₄ 0,05 | p ₂₋₃ 0,055 |
| Содержание ХС ЛПНП, ммоль/л | 2,7 [2,2; 3,1] | 3,0 [2,8; 3,4] | 3,9 [3,1; 4,4] | 3,8 [3,0; 4,3] | p ₁₋₃ 0,0027 | p ₁₋₄ 0,009 |
| Содержание глюкозы в крови натощак, ммоль/л | 4,7 [4,5; 5,2] | 5,3 [4,9; 5,5] | 5,7 [5,2; 6,1] | 6,1 [5,4; 6,2] | p ₁₋₃ 0,039 | p ₁₋₄ 0,037 |
| Содержание инсулина, мкЕд/мл | 9,7 [8,1; 10,5] | 19,7 [17,5; 21,6] | 34,1 [30,7; 36,2] | 33,9 [29,8; 36,7] | p ₁₋₃ 0,000003 p ₁₋₄ 0,000087 | p ₂₋₃ 0,004 p ₂₋₄ 0,028 |
| НОМА-IR | 1,5 [1,3; 1,9] | 2,1 [1,7; 2,3] | 3,7 [2,9; 5,1] | 4,0 [3,4; 5,8] | p ₁₋₃ 0,041 | p ₁₋₄ 0,035 |
| Индекс Саго | 0,45 [0,40; 0,49] | 0,32 [0,29; 0,36] | 0,20 [0,16; 0,26] | 0,19 [0,15; 0,27] | p ₁₋₃ 0,005 p ₁₋₄ 0,038 | p ₂₋₃ 0,05 |
| Содержание общего белка, г/л | 72,6 [67,3; 73,6] | 68,4 [63,7; 70,9] | 69,5 [65,2; 71,3] | 70,2 [67,8; 71,9] | > 0,05 | |
| Содержание альбумина, г/л | 44,6 [40,3; 46,1] | 41,0 [37,1; 43,6] | 43,3 [39,8; 45,5] | 42,8 [38,2; 44,1] | > 0,05 | |
| Активность АСТ, Ед/л | 12,9 [11,4; 19,8] | 54,9 [38,3; 59,7] | 29,5 [21,8; 32,6] | 43,9 [35,1; 46,2] | p ₁₋₂ 0,00001 p ₁₋₃ 0,0001 p ₁₋₄ 0,00001 | p ₂₋₄ 0,013 p ₂₋₃ 0,00001 p ₃₋₄ 0,0002 |
| Активность АЛТ, Ед/л | 14,8 [11,2; 18,4] | 42,2 [37,4; 55,2] | 37,2 [34,8; 43,3] | 40,9 [35,1; 48,4] | p ₁₋₂ 0,00001 p ₁₋₃ 0,0007 | p ₁₋₄ 0,00007 |
| Коэффициент Де Ритиса (АСТ/АЛТ) | 0,87 [0,65; 0,97] | 1,19 [0,97; 1,5] | 0,79 [0,68; 0,95] | 0,96 [0,89; 1,2] | p ₁₋₂ 0,002 p ₂₋₃ 0,00008 | p ₃₋₄ 0,045 |
| Активность щелочной фосфатазы, Ед/л | 75,2 [70,8; 81,1] | 163,2 [157,1; 170,2] | 148,9 [139,1; 156,3] | 155,1 [150,0; 160,3] | p ₁₋₂ 0,001 p ₁₋₃ 0,001 | p ₁₋₄ 0,004 |
| Активность гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТП), Ед/л | 15,8 [12,8; 18,9] | 59,1 [49,8; 69,5] | 29,8 [26,5; 35,2] | 47,2 [41,8; 50,2] | p ₁₋₂ 0,00001 p ₁₋₃ 0,00009 p ₁₋₄ 0,00001 | p ₂₋₃ 0,00001 p ₂₋₄ 0,059 p ₃₋₄ 0,0001 |
| Содержание общего билирубина, мкмоль/л | 12,9 [10,8; 15,2] | 22,9 [19,1; 26,9] | 15,9 [12,4; 18,5] | 24,8 [21,2; 27,0] | p ₁₋₂ 0,00001 p ₁₋₃ 0,019 p ₁₋₄ 0,00001 | p ₂₋₃ 0,00001 p ₃₋₄ 0,00001 |
| Содержание прямого билирубина, мкмоль/л | 3,6 [2,7; 4,3] | 5,7 [4,8; 6,9] | 3,9 [2,9; 5,1] | 5,1 [4,1; 6,3] | p ₁₋₂ 0,026 | |

печени, не превышающей F1. Пациенты с алкогольной и ЖБП смешанного генеза систематически потребляли алкоголь в токсических дозах, что подтверждено наличием «алкогольных стигм», данными опросников CAGE, AUDIT, данными биохимических показателей. Пациенты с АЖБП без признаков метаболического синдрома потребляли преимущественно крепкий алкоголь чаще одного раза в неделю с разовой (более 60 г) и недельной (более 420 г) дозами, ассоциированными с алкогольной болезнью печени в соответствии с новой классификацией жировой болезни печени (Rinella M.E. et al., 2023). В группе ЖБП смешанного генеза разовая и недельная дозы потребляемого алкоголя (менее 60 г разовая и менее 420 г недельная) соответствовали категории «метаболически ассоциированная алкогольная болезнь печени». Подводя итог, следует сказать, что в работе проанализированы две полярные группы в контексте потребления алкоголя – НАЖБП и АЖБП и группа с относительно эквивалентным вкладом в развитие жировой болезни печени этанола и метаболических факторов.

Таким образом, активность большей части лабораторных тестов, отражающих повреждение печени, у пациентов с ЖБП оказалась выше, чем в группе сравнения, находясь в пределах референтных значений или с минимальными отклонениями от них, что, однако, не исключает наличие стеатогепатита (Uslusoy H.S. et al, 2009). Сопоставимое с группой сравнения содержание общего белка и альбумина у пациентов с ЖБП свидетельствует о сохранности белковосинтетической функции печени. Эластичность печени, установленная методом непрямой эластометрии, имела тенденцию к увеличению у пациентов ЖБП неалкогольного и смешанного генеза, и была выше, чем в группе сравнения, при ЖБП алкогольного генеза ($p = 0,028$), подтверждая высокий фиброгенный потенциал этанола (Подымова С.Д., 2018).

Исследование электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов у пациентов с ЖБП и лиц группы контроля

При исследовании электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов в группах пациентов с жировой болезнью печени различного генеза на первом этапе были проанализированы отличия показателей эритроцитов от таковых у мужчин группы сравнения. У пациентов с жировой болезнью печени выявлено увеличение доли сфероцитарных, деформированных форм эритроцитов и снижение дискоцитарных по сравнению с группой контроля, что косвенно свидетельствует о внутриклеточном дефиците макроэргических соединений (Новицкий В.В., 2004) (таблица 2).

Способность к деформации эритроцитов пациентов с жировой болезнью печени оказалась меньше, чем в группе сравнения, что было ассоциировано со сниженной амплитудой деформации на высоких частотах электрического поля и более высокими значениями обобщенных показателей вязкости и жесткости. Клетки красной крови пациентов с ЖБП по сравнению с группой контроля обладали более высокой способностью проводить электрический ток, склонностью к образованию агрегатов, гемолизу на разных частотах электрического поля. Вместе с тем, у лиц с ЖБП отмечены более низкие уровни емкости мембран, скорости движения клеток к электродам, величины дипольного момента, чем в группе сравнения. Показатели поляризуемости на высоких частотах электрического поля (10^6 и $0,5 \times 10^6$ Гц), относительной поляризуемости оказались ниже при ЖБП, а на низких частотах ($0,1 \times 10^6$ и $0,05 \times 10^6$ Гц) – выше, чем в контроле ($p < 0,000001-0,05$) (таблица 3). У лиц с ЖБП равновесная частота оказалась смещенной в высокочастотный диапазон (более $0,5 \times 10^6$ Гц). Параметры эритроцитов у пациентов с ЖБП алкогольного и смешанного генеза в большей степени отличались от таковых в группе контроля и по сравнению с НАЖБП.

Таким образом, параметры эритроцитов пациентов с алкогольным и смешанным генезом ЖБП имели наибольшие отклонения от таковых у мужчин группы сравнения – больше морфологических изменений, меньшую способность к деформации при более высоких обобщенных показателей вязкости, жесткости, с более утолщенной мембраной, хорошо проводящей электрический ток, сниженным поверхностным зарядом, ассоциированным с образованием агрегатов, меньшей

Таблица 2. Электрические и вязкоупругие показатели эритроцитов в группе пациентов жировой болезнью печени различного генеза (M ± SD, Me [25 %; 75 %])

| Показатели | 1-я группа сравнения, n = 56 | 2-я группа с АЖБП, n = 69 | 3-я группа с НАЖБП, n = 70 | 4-я группа с ЖБП смешанного генеза, n = 67 | Критерий Манна Уитни, p = | |
|---|--|--|--|--|--|---|
| Средний диаметр эритроцита, мкм | 7,55 ± 0,018 7,56 [7,54; 7,56] | 7,57 ± 0,016 7,56 [7,56; 7,58] | 7,54 ± 0,021 7,54 [7,54; 7,56] | 7,548 ± 0,02 7,56 [7,54; 7,56] | p ₁₋₂ 0,0011 p ₂₋₃ 0,0002 | p ₂₋₄ 0,0003 |
| Доля дискоцитов, % | 78,2 ± 7,18 76,9 [75,5; 81,4] | 64,1 ± 8,31 65,7 [57,8; 71,3] | 71,7 ± 8,9 71,5 [69,8; 74,2] | 66,5 ± 9,13 67,2 [59,4; 73,5] | p ₁₋₂ < 0,00001 p ₁₋₃ 0,0016 p ₁₋₄ 0,007 | p ₂₋₃ 0,00049 p ₃₋₄ 0,021 |
| Доля сфероцитов, % | 17,3 ± 10,2 15,1 [10,2; 18,7] | 31,4 ± 14,9 30,5 [25,7; 36,8] | 22,2 ± 15,3 21,4 [18,6; 25,9] | 28,1 ± 12,8 31,7 [24,5; 35,1] | p ₁₋₂ < 0,0000 p ₁₋₄ 0,00077 | p ₂₋₃ 0,014 |
| Доля деформированных клеток, % | 11,5 ± 9,2 12,4 [10,8; 16,1] | 31,8 ± 17,5 30,7 [26,1; 34,7] | 18,8 ± 15,3 19,8 [16,7; 26,3] | 28,7 ± 18,9 29,1 [23,4; 32,8] | p ₁₋₂ 0,0011 p ₁₋₃ 0,018 p ₁₋₄ 0,0005 | p ₂₋₃ 0,0018 p ₃₋₄ 0,023 |
| Амплитуда деформации на частоте 10 ⁶ Гц·м | 7,3·10 ⁻⁶ [6,84·10 ⁻⁶ ; 7,86·10 ⁻⁶] | 5,9·10 ⁻⁶ [5,3·10 ⁻⁶ ; 6,2·10 ⁻⁶] | 6,5·10 ⁻⁶ [6,4·10 ⁻⁶ ; 6,8·10 ⁻⁶] | 6,0·10 ⁻⁶ [5,4·10 ⁻⁶ ; 6,3·10 ⁻⁶] | p ₁₋₂ < 0,0001 p ₁₋₃ < 0,0001 p ₁₋₄ < 0,0001 | p ₂₋₃ < 0,0001 p ₃₋₄ < 0,0001 |
| Степень изменения амплитуды деформации на частоте 0,5 × 10 ⁶ Гц, % | 70 [64; 74,5] | 32 [26,5; 39] | 53 [45; 57] | 34 [28,25; 41,75] | p ₁₋₂ < 0,0001 p ₁₋₃ < 0,0001 p ₁₋₄ < 0,0001 | p ₂₋₃ 0,00002 p ₃₋₄ < 0,0001 |
| Обобщенный показатель жесткости, Н/м | 8,94·10 ⁻⁶ [8,41·10 ⁻⁶ ; 9,11·10 ⁻⁶] | 9,89·10 ⁻⁶ [9,64·10 ⁻⁶ ; 10,14·10 ⁻⁶] | 9,32·10 ⁻⁶ [9,09·10 ⁻⁶ ; 9,43·10 ⁻⁶] | 9,895·10 ⁻⁶ [9,69·10 ⁻⁶ ; 10,12·10 ⁻⁶] | p ₁₋₂ < 0,0001 p ₁₋₃ 0,00002 p ₁₋₄ < 0,00001 | p ₂₋₃ 0,0042 p ₃₋₄ < 0,0001 |
| Обобщенный показатель вязкости, Па·с | 0,65 [0,61; 0,695] | 0,75 [0,735; 0,78] | 0,71 [0,69; 0,72] | 0,75 [0,73; 0,77] | p ₁₋₂ 0,0005 p ₁₋₃ < 0,00001 p ₁₋₄ 0,0004 | p ₂₋₃ 0,008 p ₃₋₄ 0,00005 |
| Емкость клеточной мембраны, Ф | 7,17·10 ⁻¹⁴ [6,85·10 ⁻¹⁴ ; 7,57·10 ⁻¹⁴] | 2,42·10 ⁻¹⁴ [1,14·10 ⁻¹⁴ ; 2,92·10 ⁻¹⁴] | 5,13·10 ⁻¹⁴ [4,24·10 ⁻¹⁴ ; 6,65·10 ⁻¹⁴] | 2,59·10 ⁻¹⁴ [1,17·10 ⁻¹⁴ ; 4,63·10 ⁻¹⁴] | p ₁₋₂ < 0,00001 p ₁₋₃ 0,000002 p ₁₋₄ < 0,00001 | p ₂₋₃ 0,00007 p ₂₋₄ 0,023 p ₃₋₄ 0,000013 |
| Электропроводность клеток, См/м | 5,49·10 ⁻⁵ [5,43·10 ⁻⁵ ; 5,71·10 ⁻⁵] | 8,66·10 ⁻⁵ [7,65·10 ⁻⁵ ; 9,17·10 ⁻⁵] | 6,91·10 ⁻⁵ [5,69·10 ⁻⁵ ; 7,21·10 ⁻⁵] | 8,75·10 ⁻⁵ [7,07·10 ⁻⁵ ; 9,14·10 ⁻⁵] | p ₁₋₂ < 0,00001 p ₁₋₃ 0,00005 p ₁₋₄ < 0,00001 | p ₂₋₃ 0,000019 p ₃₋₄ 0,000047 |
| Скорость движения E _г к электродам, мкм/с | 5,9 [5,15; 6,25] | 3,2 [2,7; 3,65] | 4,1 [3,5; 5,45] | 3,15 [2,9; 4,08] | p ₁₋₂ < 0,00001 p ₁₋₃ < 0,00001 p ₁₋₄ < 0,00001 | p ₂₋₃ 0,000018 p ₃₋₄ 0,00003 |
| Положение равновесной частоты, Гц | 0,46·10 ⁶ [0,405·10 ⁶ ; 0,505·10 ⁶] | 1,98·10 ⁶ [1,185·10 ⁶ ; 2,98·10 ⁶] | 0,51·10 ⁶ [0,33·10 ⁶ ; 0,775·10 ⁶] | 1,1·10 ⁶ [0,377·10 ⁶ ; 2,187·10 ⁶] | p ₁₋₂ < 0,0001 p ₁₋₃ 0,043 p ₁₋₄ 0,0015 | p ₂₋₃ 0,000003 p ₃₋₄ 0,00018 |
| Дипольный момент, Кл·м | 7,3·10 ⁻²¹ [6,48·10 ⁻²¹ ; 7,8·10 ⁻²¹] | 3,22·10 ⁻²¹ [2,94·10 ⁻²¹ ; 4,26·10 ⁻²¹] | 4,76·10 ⁻²¹ [4,14·10 ⁻²¹ ; 5,38·10 ⁻²¹] | 3,63·10 ⁻²¹ [3,0·10 ⁻²¹ ; 4,14·10 ⁻²¹] | p ₁₋₂ < 0,0001 p ₁₋₃ < 0,0001 p ₁₋₄ < 0,0001 | p ₂₋₃ 0,00001 p ₃₋₄ 0,000046 |
| Индекс агрегации E _г , усл. коэффициент | 0,61 [0,585; 0,625] | 0,7 [0,69; 0,72] | 0,64 [0,61; 0,69] | 0,675 [0,65; 0,713] | p ₁₋₂ < 0,0001 p ₁₋₃ 0,0001 p ₁₋₄ < 0,000 | p ₂₋₃ < 0,0001 p ₂₋₄ 0,005 p ₃₋₄ 0,004 |

резистентностью клеток с большей готовностью к гемолизу на разных частотах электрического поля, с признаками токсического воздействия на клетки (Генералов В.М., 2011). Выявленные структурно-функциональные изменения эритроцитов у пациентов с начальными стадиями ЖБП ассоциированы с развитием гипоксии (Шиффман Ф. Дж., 2009), известным фактором фиброгенеза в ткани печени (Подымова С.Д., 2018).

Исследование электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов у пациентов с жировой болезнью печени с разной степенью некрвоспалительной активности в печени

Для выявления параметров эритроцитов, являющихся наиболее значимыми для различения стеатогепатита и стеатоза, была произведена процедура нормализации значений показателей с последующим использованием метода Volcano plot (таблица 4).

Анализ показал, что для различения стеатогепатита от стеатоза значимыми оказались вязкоупругие показатели – способность клеток к деформации, отражаемая амплитудой

Таблица 3. Уровни индекса деструкции эритроцитов ($M \pm SD$) и показателей поляризуемости в группах пациентов с жировой болезнью печени различного генеза ($Me [25\%; 75\%]$) ($Me [25\%; 75\%]$)

| Показатели | 1-я группа сравнения, n = 56 | 2-я группа с НАЖБП, n = 70 | 3-я группа с АЖБП, n = 69 | 4-я группа с ЖБП смешанного генеза, n = 67 | Критерий Манна Уитни, p = |
|---|---|--|--|--|---|
| Индекс деструкции Ег на частоте 10^6 Гц, % | 0,256 ± 0,706 | 0,679 ± 1,58 | 1,089 ± 1,362 | 0,566 ± 1,75 | $p_{1-3} 0,0055$ |
| Индекс деструкции Ег на частоте $0,5 \times 10^6$ Гц, % | 0,012 ± 0,010 | 0,267 ± 0,812 | 1,056 ± 1,414 | 0,04 ± 0,219 | $p_{1-3} 0,0004$ $p_{2-3} 0,002$ $p_{3-4} 0,0001$ |
| Индекс деструкции Ег на частоте $0,1 \times 10^6$ Гц, % | 0,178 ± 0,613 | 0,241 ± 0,769 | 0,456 ± 0,992 | 0,663 ± 1,503 | $p > 0,05$ |
| Индекс деструкции Ег на частоте $0,05 \times 10^6$ Гц, % | 0,056 ± 0,271 | 0,228 ± 0,888 | 0,322 ± 0,884 | 0,183 ± 0,571 | $p > 0,05$ |
| Относительная поляризуемость | 1,195 ± 0,547 1,11 [0,635; 1,535] | 1,365 ± 0,521 1,2 [1,01; 1,58] | 0,862 ± 0,313 0,85 [0,66; 1,08] | 0,95 ± 0,463 0,84 [0,582; 1,227] | $p_{1-3} 0,0049$ $p_{2-3} 0,000016$ $p_{1-4} 0,042$ $p_{2-4} 0,0005$ |
| Поляризуемость на частоте 10^6 Гц, м ³ | $0,651 \cdot 10^{-15}$ [$0,56 \cdot 10^{-15}$; $0,767 \cdot 10^{-15}$] | $0,625 \cdot 10^{-15}$ [$0,504 \cdot 10^{-15}$; $0,956 \cdot 10^{-15}$] | $0,333 \cdot 10^{-15}$ [$0,255 \cdot 10^{-15}$; $0,376 \cdot 10^{-15}$] | $0,435 \cdot 10^{-15}$ [$0,253 \cdot 10^{-15}$; $0,525 \cdot 10^{-15}$] | $p_{1-3} 0,000012$ $p_{2-4} 0,0025$ $p_{1-4} 0,0044$ $p_{3-4} 0,037$ $p_{2-3} 0,000048$ |
| Поляризуемость на частоте $0,5 \times 10^6$ Гц, м ³ | $0,61 \cdot 10^{-15}$ [$0,53 \cdot 10^{-15}$; $0,85 \cdot 10^{-15}$] | $0,485 \cdot 10^{-15}$ [$0,317 \cdot 10^{-15}$; $0,691 \cdot 10^{-15}$] | $0,311 \cdot 10^{-15}$ [$0,233 \cdot 10^{-15}$; $0,458 \cdot 10^{-15}$] | $0,447 \cdot 10^{-15}$ [$0,293 \cdot 10^{-15}$; $0,561 \cdot 10^{-15}$] | $p_{1-2} 0,012$ $p_{1-4} 0,042$ $p_{1-3} 0,0012$ |
| Поляризуемость на частоте $0,1 \times 10^6$ Гц, м ³ | $-0,66 \cdot 10^{-15}$ [$-0,395 \cdot 10^{-15}$; $-1,08 \cdot 10^{-15}$] | $-0,447 \cdot 10^{-15}$ [$-0,349 \cdot 10^{-15}$; $-0,745 \cdot 10^{-15}$] | $-0,373 \cdot 10^{-15}$ [$-0,296 \cdot 10^{-15}$; $-0,459 \cdot 10^{-15}$] | $-0,517 \cdot 10^{-15}$ [$-0,311 \cdot 10^{-15}$; $-0,731 \cdot 10^{-15}$] | $p_{1-3} 0,0016$ |
| Поляризуемость на частоте $0,05 \times 10^6$ Гц, м ³ | $-0,51 \cdot 10^{-15}$ [$-0,355 \cdot 10^{-15}$; $-0,855 \cdot 10^{-15}$] | $-0,424 \cdot 10^{-15}$ [$-0,328 \cdot 10^{-15}$; $-0,611 \cdot 10^{-15}$] | $-0,367 \cdot 10^{-15}$ [$-0,309 \cdot 10^{-15}$; $-0,471 \cdot 10^{-15}$] | $-0,436 \cdot 10^{-15}$ [$-0,269 \cdot 10^{-15}$; $-0,658 \cdot 10^{-15}$] | $p_{1-3} 0,002$ |

деформации на частоте 10^6 Гц, обобщенные показатели вязкости, жесткости, а также характеристики клетки, ассоциированные с состоянием мембран – емкость, дипольный момент, электропроводность и параметр, связанный резистентностью эритроцитов – поляризуемость клеток на частоте 10^6 Гц.

Объединение вышеуказанных показателей эритроцитов в диагностическую «панель» при проведении ROC-анализа для дифференцирования стеатогепатита от стеатоза обеспечило область под кривой (AUC) 0,904, чувствительность 0,9, специфичность 0,83 (рисунок 2А).

С использованием перечня вышеописанных параметров эритроцитов был вычислен диагностический индекс Y_D по формуле

$$Y_D = 1/[1+\exp(-SD1)], \quad (3)$$

где $SD = -0,028 \cdot \text{амп.} + 0,198 \cdot \text{жест} - 0,0311 \cdot \text{диполь} + 0,219 \cdot \text{вязк} - 0,514 \cdot \text{емк} + 0,041 \cdot \text{электропров.} - 0,0419 \cdot \text{поляр.}$

Таблица 4. Электрические и вязкоупругие параметры эритроцитов, исследованные методом Volcano plot (непарная статистика), у пациентов с жировой болезнью печени – потенциальные биомаркеры стеатогепатита

| Электрические и вязкоупругие параметры эритроцитов | Кратность изменений (FC) | log2(FC) | $-\log_{10}(p)$ | Значения «p» (raw.p val) |
|---|--------------------------|----------|-----------------|--------------------------|
| Амплитуда деформации на частоте 10^6 Гц, м | 0,5151 | -0,9831 | 3,3672 | 0,00032 |
| Обобщенный показатель жесткости, Н/м | 1,7118 | 0,5986 | 2,1912 | 0,00571 |
| Обобщенный показатель вязкости, Па х с | 1,6542 | 0,6234 | 2,0473 | 0,00671 |
| Электропроводность, См/м | 1,4912 | 0,59243 | 2,0023 | 0,00812 |
| Дипольный момент, Кл/м | 0,7775 | -0,3948 | 1,9521 | 0,0091346 |
| Емкость клеточной мембраны, Ф | 0,4064 | -0,4971 | 1,8842 | 0,01415 |
| Поляризуемость на частоте 10^6 Гц, м ³ | 0,5633 | -0,5366 | 1,7060 | 0,0346 |

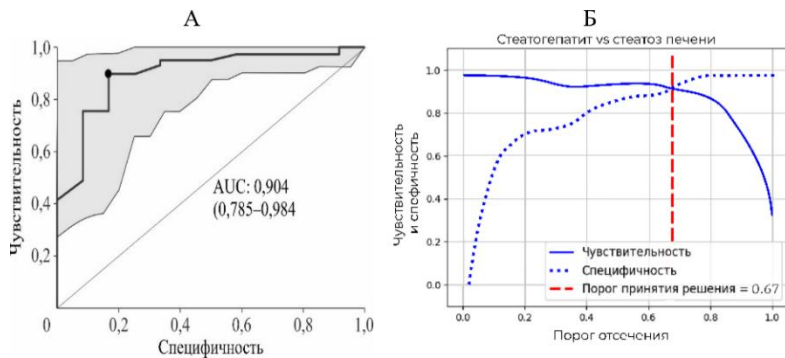


Рисунок 2. А. ROC-кривая «панели» электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов при дифференцировании стеатоза печени от стеатогепатита; Б. Пороговое значение индекса Y_D для различения пациентов со стеатогепатитом от пациентов со стеатозом печени

Затем определены пороговое значение индекса, составляющее 0,67 (рисунок 2Б). При значении диагностического индекса Y_D , превышающем 0,67, принимают решение о вероятности наличия стеатогепатита, при значении индекса менее 0,67 – о вероятности наличия стеатоза печени.

При изучении корреляций между вязкоупругими, электрическими показателями и биохимическими параметрами, свидетельствующими о выраженной некрвоспалительной активности в печени, выявлены обратные ассоциации между амплитудой деформации эритроцитов, скоростью движения к электродам, поляризуемостью на частоте 10^6 Гц, емкостью мембран эритроцитов, величиной дипольного момента и показателями синдрома цитолиза, маркерами воспаления (амплитуда деформации обратно коррелировала с активностью АЛТ ($r = -0,277$), ($p = 0,013$), АСТ ($r = -0,264$), ($p = 0,028$), содержанием железа сыворотки ($r = -0,318$), ($p = 0,007$), уровнем С-реактивного белка ($r = -0,549$), ($p < 0,0001$)). Связи значений обобщенных показателей вязкости, жесткости, доли деформированных клеток, электропроводности, положения равновесной частоты с теми же биохимическими параметрами оказались прямыми (электропроводность коррелировала с уровнями СРБ ($r = 0,298$), ($p = 0,011$), ферритина ($r = 0,314$), ($p = 0,003$), железа сыворотки ($r = 0,451$), ($p = 0,008$)). Установленные корреляции маркеров цитолиза, воспаления с вязкоупругими показателями эритроцитов, вероятно, отражают более выраженные реологические нарушения при стеатогепатите с большим потенциалом прогрессирования (Idalsoaga F. et al., 2020).

Установлены обратные корреляции между уровнями фибриногена и величиной дипольного момента ($r = -0,675$), ($p < 0,0001$), значениями скорости движения эритроцитов к электродам ($r = -0,428$), ($p = 0,042$). Ассоциации уровней С-реактивного белка с показателями эритроцитов, косвенно отражающими их заряд, также оказались обратными: для дипольного момента ($r = -0,507$), ($p = 0,004$), для скорости движения клеток к электродам ($r = -0,534$), ($p = 0,004$). Аналогичный тренд выявлен для величин ферритина: корреляции последнего с величиной дипольного момента ($r = -0,417$), ($p = 0,032$); со скоростью движения клеток – ($r = -0,411$), ($p = 0,007$). Выявленные корреляции, возможно, обусловлены способностью эритроцитов адсорбировать на поверхности мембран крупномолекулярные белки, независимо от их антигенной структуры (Новицкий В.В., 2004; Шиффман Ф. Дж., 2009), что приводит к снижению поверхностного отрицательного заряда клеток (Кручинина М.В., 2011).

Диагностические панели для дифференцирования ЖБП различного генеза

Дифференцирование пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени и алкогольной жировой болезнью печени

Для выявления различий в нормализованных уровнях параметров эритроцитов у пациентов с АЖБП и НАЖБП был выполнен дискриминантный анализ методом наименьших квадратов (PLS-DA) (рисунок 3А). Использование метода Volcano plot обеспечило установление электрических, вязкоупругих параметров эритроцитов, наиболее значимых для различения пациентов с алкогольным и неалкогольным генезом жировой болезни печени (таблица 5). Данные ROC-анализа представлены на рисунке 3Б.

Рисунок 3. А. Дискриминантный анализ для различия уровней параметров эритроцитов пациентов с ЖБП алкогольного и неалкогольного генеза (розовое облако, красные точки – уровни параметров в группе с АЖБП, зеленое облако, зеленые точки – в группе с НАЖБП). Б. ROC-кривая комбинированной модели, включающей пять параметров эритроцитов.

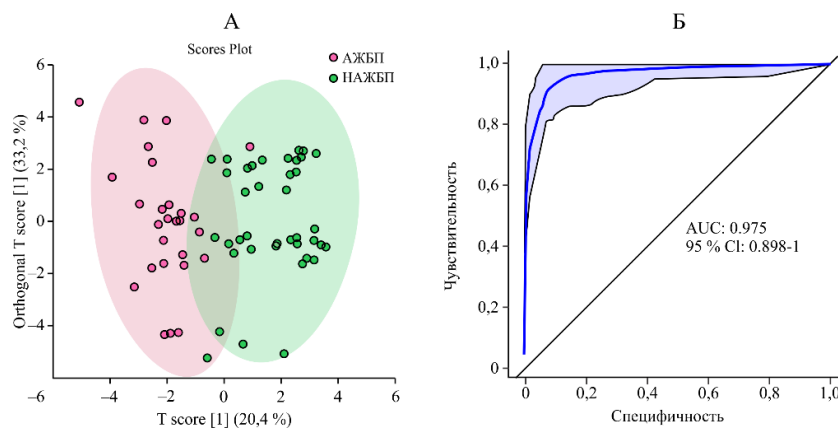


Таблица 5. Электрические и вязкоупругие параметры эритроцитов, исследованные методом Volcano plot (непарная статистика), – маркеры для дифференцирования НАЖБП и АЖБП

| Электрические и вязкоупругие параметры эритроцитов | Кратность изменений (FC) | log2(FC) | -log10(p) | Значения «p» (raw.p val) |
|---|--------------------------|----------|-----------|--------------------------|
| Емкость клеточной мембраны, Ф | 2,9469 | 1,5592 | 10,919 | 1,21E-11 |
| Степень изменения амплитуды деформации на частоте $0,5 \times 10^6$ Гц, % | 1,7334 | 0,79357 | 7,6304 | 2,34E-08 |
| Поляризуемость на частоте 10^6 Гц, м ³ | 2,3093 | 1,2074 | 7,0279 | 9,38E-08 |
| Положение равновесной частоты, Гц | 0,26012 | -1,9428 | 5,6718 | 2,13E-06 |
| Скорость движения Ег к электродам, мкм/с | 1,5737 | 0,65416 | 5,3641 | 4,32E-06 |
| Дипольный момент, Кл/м | 1,5028 | 0,58767 | 4,7807 | 1,66E-05 |
| Относительная поляризуемость | 1,8131 | 0,85847 | 4,628 | 2,35E-05 |
| Индекс деструкции на частоте $0,5 \times 10^6$ Гц (%) | 0,454 | -1,1392 | 1,7808 | 0,016564 |

Наиболее значимыми для различия НАЖБП и АЖБП оказались емкость клеточной мембраны ($p = 1,21E-11$), степень изменения амплитуды деформации эритроцитов на частоте $0,5 \times 10^6$ Гц ($p = 2,38E-08$), поляризуемость клеток на частоте 10^6 Гц ($p = 9,38E-08$), скорость движения клеток к электродам ($p = 4,32E-06$), величина дипольного момента ($p = 1,66E-05$), относительная поляризуемость ($p = 2,35E-05$), уровни которых были выше у пациентов с НАЖБП по сравнению с АЖБП. Напротив, индекс деструкции эритроцитов на частоте $0,5 \times 10^6$ Гц оказался выше в группе с АЖБП, чем с НАЖБП ($p = 0,016$), а равновесная частота была сдвинута в высокочастотный диапазон при алкогольном генезе по сравнению с НАЖБП ($p = 2,13E-06$). Значимость данных параметров для различия НАЖБП и АЖБП, вероятно, обусловлена выраженным влиянием высоких доз этанола на структуру мембран эритроцитов (уровень сиаловых кислот, соотношение липидных компонентов, активность мембраносвязанных ферментов, трансмембранный транспорт электролитов) и гемоглобина (аддукты с этанолом, ацетальдегидом, спектрин-гемоглобиновые ассоциаты) (Rabai M. et al., 2014; Palmieri V.O. et al., 2006; Liu L. et al., 2016; Brun J.F. et al., 2021).

При проведении ROC-анализа для различия АЖБП и НАЖБП оптимальной оказалась модель, состоящая из пяти параметров: положение равновесной частоты, поляризуемость клеток на частоте 10^6 Гц, электропроводность клеток, емкость мембран и степень изменения амплитуды деформации на частоте $0,5 \times 10^6$ Гц, которая при небольшом перечне параметров эритроцитов обеспечила AUC 0,975 с чувствительностью 96,3 %, специфичностью 91,8 % (рисунок 3 Б)

Дифференцирование пациентов со смешанным генезом жировой болезни печени и неалкогольной жировой болезни печени

Для выявления различий в нормализованных уровнях параметров эритроцитов у пациентов с ЖБП смешанного генеза и НАЖБП выполнен дискриминантный анализ (PLS-DA), который показал наличие перечня дифференцирующих показателей эритроцитов. Наиболее значимыми для различия пациентов с неалкогольным и смешанным генезом ЖБП (таблица 6) оказались

Таблица 6. Электрические и вязкоупругие параметры эритроцитов, исследованные методом Volcano plot (непарная статистика), у пациентов жировой болезнью печени различного генеза (НАЖБП против ЖБП смешанного генеза) – маркеры для дифференцирования

| Электрические и вязкоупругие параметры эритроцитов | Кратность изменений (FC) | log ₂ (FC) | -log ₁₀ (p) | Значения «p» (raw.p val) |
|--|--------------------------|-----------------------|------------------------|--------------------------|
| Поляризуемость на частоте 10 ⁶ Гц, м ³ | 1,6423 | 0,71569 | 4,188 | 6,49E-05 |
| Положение равновесной частоты, Гц | 0,30763 | -1,7007 | 3,2932 | 0,000509 |
| Емкость клеточной мембраны, Ф | 1,6034 | 0,68115 | 3,1137 | 0,00077 |
| Относительная поляризуемость | 1,5037 | 0,58854 | 2,9609 | 0,001094 |
| Индекс деструкции на частоте 0,1 × 10 ⁶ Гц (%) | 0,54131 | -0,88547 | 1,5092 | 0,047761 |

поляризуемость клеток на частоте 10⁶ Гц (p = 6,49E-05), положение равновесной частоты (p = 0,0005), емкость мембран (p = 0,0007), относительная поляризуемость (p = 0,001), индекс деструкции эритроцитов на частоте 0,1 × 10⁶ Гц (p = 0,047). Значения емкости мембраны, поляризуемости на частоте 10⁶ Гц, относительной поляризуемости оказались выше при НАЖБП по сравнению со смешанным генезом ЖБП. Напротив, при смешанном генезе ЖБП равновесная частота была более сдвинута в высокочастотный диапазон, а деструкция клеток на частоте 0,1 × 10⁶ Гц в более выражена, чем при НАЖБП. Значимость выявленных параметров эритроцитов для различения НАЖБП и ЖБП смешанного генеза, возможно, связана с большими сдвигами в структуре мембран, резистентности клеток при одновременном воздействии метаболических факторов и этанола у пациентов со смешанным генезом ЖБП (Massaccesi L. et al., 2020; Tóth M.E. et al., 2014; Wang Y. et al., 2021; Palmieri V.O., et al., 2006; Tarantino G. et al., 2024).

Оптимальной по диагностической точности при минимальном количестве составляющих оказалась модель, включающая параметры – степень деформации эритроцитов на частоте 0,5 × 10⁶ Гц, поляризуемость клеток на частоте 10⁶ Гц и емкость мембран, обеспечивая AUC 0,829 (ДИ 0,742–0,916), чувствительность 80,9 %, специфичность 83,3 %.

Дифференцирование пациентов со смешанным генезом жировой болезни печени и алкогольной жировой болезни печени

В паре «группа с ЖБП смешанного генеза против группы с АЖБП» параметров эритроцитов, уровни которых можно было использовать для различения, оказалось существенно меньше, чем в паре «ЖБП смешанного генеза против НАЖБП». Данное обстоятельство подтверждено при использовании для анализа метода Volcano plot (таблица 7). Значения только двух параметров красной крови значимо отличали ЖБП смешанного от АЖБП – это индекс деструкции на частоте 0,5 × 10⁶ Гц, величины которого были выше при АЖБП (p = 0,0007), и емкость мембран клеток, уровни которой оказались выше при ЖБП смешанного генеза (p = 0,011). Ключевая роль данных параметров для различения АЖБП и ЖБП смешанного генеза, вероятно, связана с зависимостью степени гемолиза эритроцитов, модификации структуры их мембран от дозы этанола (Bertola A. et al., 2013; Mueller S. et al., 2023; Zheng C. et al. 2024).

Определение ранга степени вклада параметров эритроцитов в дифференцирование ЖБП смешанного генеза и АЖБП также показало значимость поляризуемости на частоте 10⁶ Гц, скорости движения клеток к электродам, доли деформированных клеток, которые оказались выше у пациентов с ЖБП смешанного генеза, чем при АЖБП (рисунок 4).

Таблица 7. Электрические и вязкоупругие параметры эритроцитов, исследованные методом Volcano plot (непарная статистика), у пациентов с АЖБП и ЖБП смешанного генеза – маркеры для дифференцирования

| Электрические и вязкоупругие параметры эритроцитов | Кратность изменений (FC) | log ₂ (FC) | -log ₁₀ (p) | Значения «p» (raw.p val) |
|---|--------------------------|-----------------------|------------------------|--------------------------|
| Индекс деструкции на частоте 5 × 10 ⁵ Гц (%) | 3,6763 | 1,8787 | 3,1453 | 0,000715 |
| Емкость клеточной мембраны, Ф | 0,5566 | -0,84774 | 1,9273 | 0,011817 |

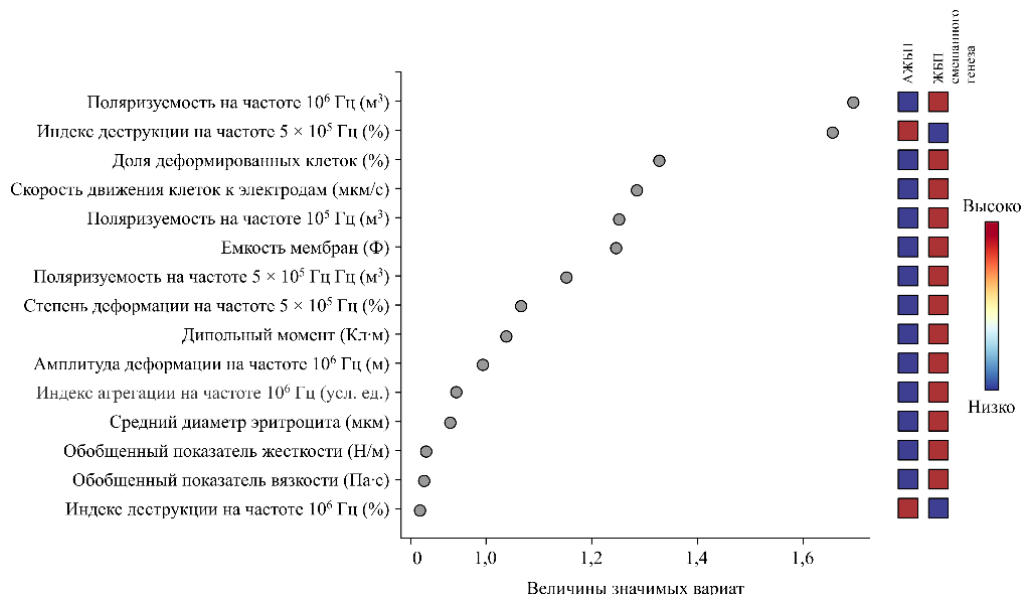


Рисунок 4. Ранжирование электрических, вязкоупругих параметров эритроцитов по вкладу в дифференцирование жировой болезни печени алкогольного и смешанного генеза

При проведении ROC-анализа построена модель, оптимальная с точки зрения чувствительности и специфичности при минимальном перечне показателей, состоящая из 3-х характеристик – индекса деструкции на частоте $0,5 \times 10^6$ Гц, емкости мембран, поляризуемости на частоте 10^6 Гц – AUC 0,751 (ДИ 0,611–0,908), чувствительность 79,5 %, специфичность 74,7 %).

При корреляционном анализе выявлены ассоциации электрических, вязкоупругих характеристик красных клеток крови с показателями стиля потребления алкоголя и проявлениями метаболического синдрома, соответствующие вышеописанным наборам дифференциально-диагностических показателей диэлектрофореза эритроцитов для различения ЖБП различного генеза.

Эксперимент *in vitro* с раствором этанола для дифференцирования пациентов с жировой болезнью печени алкогольного и неалкогольного генеза

При выполнении исследования был предложен оригинальный экспресс-метод установления алкогольного или неалкогольного генеза жировой болезни печени (оформленный в виде патента на изобретение) при проведении эксперимента *in vitro* со взвесями эритроцитов и 10 мкл 0,02 % раствора этанола в течение 300 секунд. Определение вязкоупругих характеристик эритроцитов с помощью метода диэлектрофореза проводилось дважды: оценивались «базовые» уровни показателей до экспозиции с раствором этанола и величины параметров эритроцитов после экспозиции с этанолом в течение 300 с. Затем анализировали тренды изменений показателей эритроцитов в динамике у пациентов с алкогольной и неалкогольной жировой болезнью печени.

Для проведения эксперимента были отобраны эритроциты мужчин с НАЖБП ($n = 26$) и АЖБП ($n = 24$), лица обеих групп не различались по возрасту, биохимическим показателям.

При исследовании «базовых» уровней показателей эритроцитов установлено, что у пациентов с НАЖБП амплитуда деформации клеток красной крови на высоких частотах (1×10^6 , $0,5 \times 10^6$ Гц) НПЭП значимо выше, а обобщенные показатели вязкости и жесткости ниже, чем у больных с АЖБП. После экспозиции с раствором этанола тренды изменений вязкоупругих параметров клеток красной крови отличались в группах с разной этиологией жировой болезни печени. Неалкогольный генез ЖБП был ассоциирован со снижением способности клеток к деформации под влиянием этанола, при алкогольной этиологии деформируемость клеток увеличивалась ($p < 0,01$) (рисунок 5).

Средняя амплитуда деформации (M) до экспозиции с раствором этанола соответствовала M1, а после экспозиции – M2. В процессе проведения эксперимента сравнивали результаты изменения

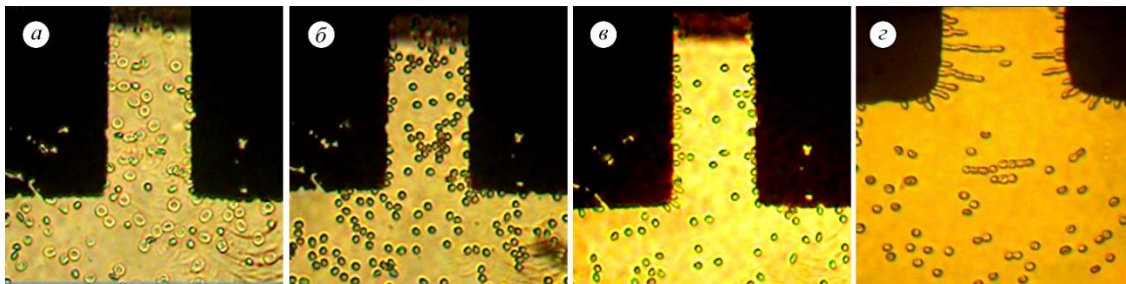


Рисунок 5. Изменение амплитуды деформации эритроцитов при экспозиции с 10 мкл 0,02 % раствора этанола в течение 300 с (а, б – эксперимент с эритроцитами пациентов с НАЖБП; в, з – эксперимент с эритроцитами пациентов с АЖБП; а, в – до внесения раствора этанола; б, з – после экспозиции с этанолом)

средней амплитуды деформации двух независимых выборок с тем, чтобы оценить достоверность разности ($M1 - M2$). Если эта разность значима и положительна, то средние значения $M1$ и $M2$ относятся к разным генеральным совокупностям, и делается вывод о высокой вероятности наличия неалкогольной жировой болезни печени. Если эта разность значима и отрицательна, то средние значения $M1$ и $M2$ относятся к разным генеральным совокупностям, и формируется заключение о высокой вероятности наличия алкогольной жировой болезни печени (таблица 8).

Улучшение вязкоупругих параметров эритроцитов у пациентов с АЖБП в состоянии абстиненции после экспозиции с этанолом, вероятно, обусловлено появлением энергетического субстрата, «встроенного» в метаболизм клеток на фоне систематического потребления алкоголя (Bertola A. et al., 2013; Hardianto A. et al., 2023). Напротив, у пациентов с НАЖБП для эритроцитов, не адаптированных к систематическому воздействию этанола, реализуется его эффект как мембранотропного токсина с дезорганизацией трансмембранного переноса электролитов, блокадой активности переносчика глюкозы через мембрану, нарушением межклеточных контактов, взаимодействий рецепторов клетки с сигнальными молекулами (Киселев М.А. и соав., 2006; Бохан Н.А. и соавт., 2004; Buyukokuroglu M.E. et al. 2002).

Для оценки возможностей предложенного подхода по установлению генеза жировой болезни печени (алкогольный против неалкогольного) произведено сравнение результатов метода с заключением по совокупности клинико-инструментальных методов исследования по вероятному диагнозу пациента (Гринхальх Т., 2018). Проведенный анализ показал достаточно высокие уровни чувствительности (87,5 %), специфичности (96,2 %), прогностической ценности положительного (95,4 %) и отрицательного результата (89,3 %), а также индекса точности подхода (92 %).

Таблица 8. Вязкоупругие параметры эритроцитов у пациентов с алкогольной и неалкогольной жировой болезнью печени до и после экспозиции с раствором этанолом ($M \pm SD$)

| Группы | Группа пациентов с алкогольной жировой болезнью печени (АЖБП) (n = 24) | Группа пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени (НАЖБП) (n = 26) |
|--|--|---|
| Средняя амплитуда деформации в выборке эритроцитов начальная – $M1$, [м] | $3,2E-06 \pm 6,7E-07$ | $4,3E-06 \pm 7E-07^*$ |
| Средняя амплитуда деформации в выборке эритроцитов после экспозиции в растворе этанола – $M2$, [м] | $4,4E-06 \pm 6,7E-07^{\wedge}$ | $3,1E-06 \pm 8E-07^{*\wedge}$ |
| Разница средних $M1-M2$ | $-1,2E-06$ | $1,2E-06$ |
| $2 \cdot \sqrt{m_1^2 + m_2^2}$ | $4,0E-07$ | $4,3E-07$ |
| Обобщенный показатель жесткости (начальный) $\times 10^{-6}$, [Н/м] – $C1$ | $9,47 \pm 6,43$ | $6,87 \pm 6,05^{**}$ |
| Обобщенный показатель жесткости (после экспозиции с раствором этанола) $\times 10^{-6}$, [Н/м] – $C2$ | $7,55 \pm 7,72^{\wedge\wedge}$ | $8,15 \pm 9,2^{*\wedge\wedge}$ |
| Разница средних $C1-C2$ | $1,92E-06$ | $-1,28E-06$ |
| Обобщенный показатель вязкости (начальный) $\times 10^{-1}$, [Па·с] – $\eta 2$ | $7,52 \pm 2,9$ | $6,11 \pm 3,5^{**}$ |
| Обобщенный показатель вязкости (после экспозиции с раствором этанола) $\times 10^{-1}$, [Па·с] – $\eta 2$ | $6,25 \pm 2,73^{\wedge}$ | $7,73 \pm 2,85^{*\wedge\wedge}$ |
| Разница средних $\eta 1 - \eta 2$ | $1,27E-01$ | $-1,62E-01$ |

Примечания: 1. M – среднее значение, SD – среднее квадратическое отклонение; 2. * – статистическая значимость (p) отличия от группы с АЖБП (* – $p < 0,05$), (** – $p < 0,01$); \wedge – статистическая значимость (p) отличия начальных значений показателей от значений таковых после экспозиции с раствором этанола (\wedge – $p < 0,05$), ($\wedge\wedge$ – $p < 0,01$).

Изменения параметров эритроцитов в динамике абстинентного синдрома у пациентов с АЖБП и снижения массы тела у пациентов с НАЖБП

Были проанализированы сдвиги в уровнях параметров эритроцитов в течение 3 месяцев у 22 пациентов (возраст $56,4 \pm 0,3$ года) с неалкогольной ЖБП в процессе снижения массы тела и у 24 пациентов (возраст $57,2 \pm 13,2$ года) – с ЖБП алкогольного генеза при воздержании от алкоголя. Обследование в динамике проведено через 7-10 дней, затем через 1, 2 и 3 месяца.

Состояние абстиненции у пациентов с АЖБП объективно подтверждалось снижением активности трансаминаз, ГГТП, уровня ХС ЛПВП, СКОЭ, мочевой кислоты. У пациентов с НАЖБП при снижении массы тела на 5-7% от исходной отмечены лишь тенденции к улучшению биохимических параметров. В те же сроки у пациентов обеих групп были изучены электрические и вязкоупругие параметры эритроцитов.

На фоне воздержания от приема алкоголя отмечена положительная динамика уровней параметров клеток у пациентов с АЖБП: уменьшился диаметр эритроцитов; доля деформированных клеток; возрос поверхностный заряд (увеличились значения скорости движения клеток к электродам, дипольный момент); поляризуемость на частоте 10^6 Гц; значительно снизилась электропроводность; увеличилась емкость клеток. Произошло значимое увеличение деформируемости эритроцитов на фоне снижения обобщенных показателей вязкости и жесткости. Снижился уровень гемолиза клеток крови на разных частотах электрического поля и агрегатообразование. Отмечено смещение равновесной частоты в низкочастотный диапазон ($p < 0,001-0,05$). Ряд параметров эритроцитов «отреагировал» на состояние абстиненции в более ранние сроки (в течение первого месяца) – это положение равновесной частоты, поляризуемость на частоте 10^6 Гц, емкость клеток, величина дипольного момента, электропроводность, скорость движения к электродам (серый фон рисунка 6А). Такие показатели, как амплитуда деформации, обобщенные показатели вязкости, жесткости, индексы деструкции, агрегации изменились в более отдаленный период (~конец третьего месяца) ($p = 0,004-0,02$) (желтый фон рисунка 6А). Вероятно, наблюдаемые отличия связаны с разной скоростью реагирования структур клетки на внешние воздействия, включая этанол, как и способностью их восстановления (Maturu P. et al., 2013).

У пациентов с НАЖБП через 3 месяца удалось достичь снижения массы тела на 5–7 % от исходного веса. Статистически значимых изменений вязкоупругих, электрических показателей клеток красной крови в этой группе пациентов не было выявлено и к концу третьего месяца. По ряду параметров (амплитуда деформации, индексы деструкции на разных частотах, величина дипольного момента) отмечены положительные тенденции, не достигающие, однако, уровня достоверности (рисунок 6Б). Вероятно, снижение массы тела на 5-7% недостаточно как для обратного развития стеатоза печени (Loomba R. et al., 2021), так и для положительной динамики вязкоупругих параметров эритроцитов

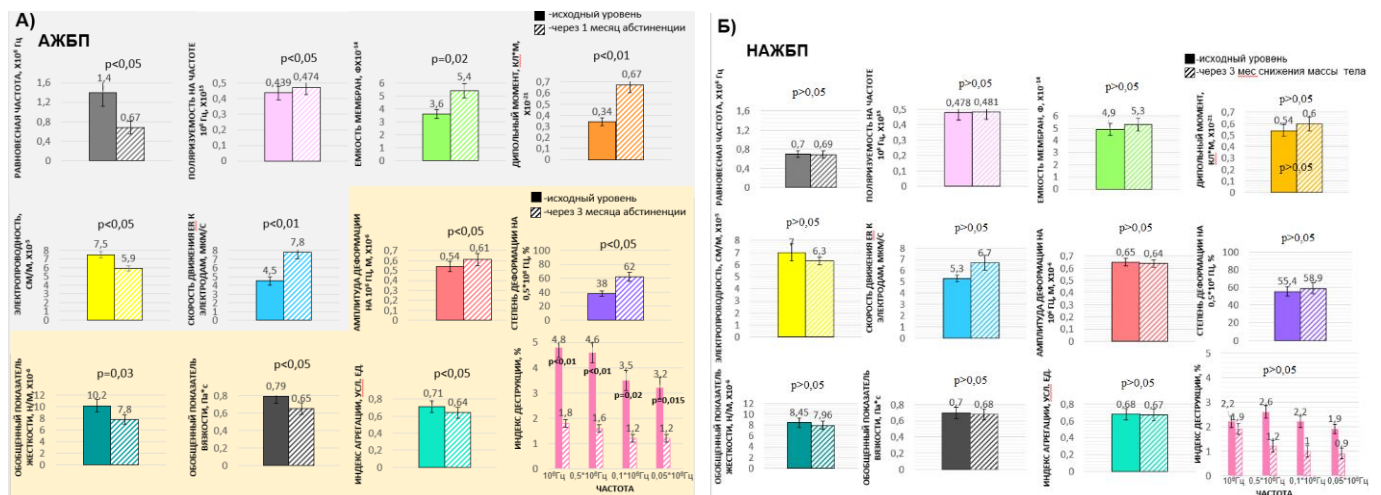


Рисунок 6. Электрические и вязкоупругие параметры эритроцитов групп обследуемых исходно и в динамике абстинентного синдрома (у пациентов с АЖБП – часть А) и снижения массы тела (у больных с НАЖБП – часть Б)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенное исследование выявило особенности электрических, вязкоупругих параметров эритроцитов у пациентов с жировой болезнью печени в отличие от лиц контрольной группы, у пациентов с различным генезом заболевания (неалкогольный, алкогольный, смешанный (метаболический + алкогольный)), с разной степенью некровоспалительной активности в печени, а также в динамике абстинентного синдрома и снижения массы тела. Метод диэлектрофореза позволил выявить структурно-функциональные изменения в клетках красной крови на ранних стадиях заболевания при минимальной выраженности фиброза в печени. Возможность ранней диагностики исключительно важна, поскольку стадия стеатоза при жировой болезни печени является полностью обратимым состоянием при воздержании от алкоголя, коррекции проявлений метаболического синдрома.

Предложенный оригинальный метод экспресс-диагностики алкогольного и неалкогольного генеза жировой болезни печени основывается на разной реакции вязкоупругих параметров эритроцитов при экспозиции клеток с этанолом, что патогенетически обусловлено активизацией метаболических путей алкоголя при АЖБП и его токсическим эффектом при НАЖБП.

Представленная «панель» структурно-функциональных характеристик эритроцитов показала высокую диагностическую точность при дифференцировании стеатогепатита от стеатоза, что подтверждается тесными ассоциациями электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов с показателями синдрома цитолиза, маркерами воспаления. Невысокая время и трудозатратность метода диэлектрофореза позволяет в короткие сроки выявлять пациентов со стеатогепатитом, нуждающихся в углубленном обследовании. Использование данного подхода в динамике даст возможность объективизировать эффективность проведенной терапии.

Выявленные изменения электрических, вязкоупругих параметров эритроцитов в различные сроки в динамике абстинентного синдрома у пациентов с алкогольной жировой болезнью печени позволяют верифицировать воздержание от алкоголя и контролировать процесс лечения.

Изменения свойств эритроцитов ассоциированы с нарушениями микроциркуляции. Нарастание гипоксии, ишемии в ткани печени тесно связано с фиброгенезом, прогрессированием диффузной патологии печени. Поэтому терапевтические подходы, направленные на повышение пластичности эритроцитов, их резистентности, поверхностного заряда, снижающие степень гемолиза, образования агрегатов клеток, вероятно, могут оптимизировать лечение пациентов с ЖБП.

Внедрение адекватных подходов мониторинга жировой болезни печени, основанного на своевременном использовании малоинвазивных маркеров ее прогрессирования, в частности, вязкоупругих, электрических параметров эритроцитов, с последующим внедрением соответствующих методов лечения, является перспективным инструментом для изменения течения данной патологии.

ВЫВОДЫ

1. Пациенты с алкогольной жировой болезнью печени и жировой болезнью печени смешанного генеза (метаболический + алкогольный) на фоне систематического потребления токсических доз алкоголя имели минимальные отклонения в уровне печеночных показателей и степень фиброза печени, не превышающую первой, что затрудняет своевременную диагностику.

2. Свойства эритроцитов, выявленные методом диэлектрофореза, при жировой болезни печени разной этиологии и степени некровоспалительной активности существенным образом изменяются. Клетки красной крови пациентов с жировой болезнью печени имели больше морфологических изменений, меньшую деформируемость, более измененную структуру мембран (сниженная емкость, повышенная электропроводность), сниженный поверхностный заряд (отражаемым скоростью движения клеток к электродам и дипольным моментом), склонность к образованию агрегатов, к гемолизу на разных частотах электрического поля, чем у лиц группы сравнения ($p < 0,0001-0,05$). Наиболее выраженные отклонения электрических,

вязкоупругих параметров эритроцитов установлены при жировой болезни печени алкогольного и смешанного (метаболический + алкоголь) генеза.

3. Различение пациентов с жировой болезнью печени алкогольного и неалкогольного генеза обеспечили емкость клеточной мембраны, степень изменения амплитуды деформации эритроцитов на частоте $0,5 \times 10^6$ Гц, поляризуемость клеток на частоте 106 Гц, скорость движения клеток к электродам, дипольный момент, относительная поляризуемость, индекс деструкции эритроцитов на частоте $0,5 \times 10^6$ Гц, положение равновесной частоты ($p = 0,0001-0,016$) (AUC 0,975, чувствительность 96,3 %, специфичность 91,8 %). При различении жировой болезни печени смешанного генеза (метаболический + алкогольный) от неалкогольной жировой болезни печени ключевую роль сыграли степень деформации эритроцитов на частоте $0,5 \times 10^6$ Гц, поляризуемость клеток на частоте 106 Гц и емкость мембран; модель из этих параметров обеспечила AUC 0,829 (ДИ 0,742–0,916), чувствительность 80,9 %, специфичность 83,3 %. Комбинированная модель с включением трех параметров эритроцитов – индекса деструкции на частоте $0,5 \times 10^6$ Гц, емкости мембран, поляризуемости на частоте 10⁶ Гц показала высокие уровни диагностической точности – AUC 0,751 (ДИ 0,611–0,908) с чувствительностью 79,5 %, специфичностью 74,7 % при различении ЖБП смешанного генеза от АЖБП.

4. Предложенный экспресс-метод для установления этиологии жировой болезни печени, основанный на различном эффекте кратковременной экспозиции с физиологическими низкими дозами раствора этанола эритроцитов пациентов с АЖБП и НАЖБП (инверсные изменения показателей: при алкогольном генезе – повышение амплитуды деформации со снижением обобщенных вязкости и жесткости, и, напротив, при неалкогольном генезе – снижение амплитуды деформации на фоне повышения обобщенных вязкости и жесткости) обеспечил чувствительность 87,5 %, специфичность 96,2 %, прогностическую ценность положительного 95,4 % и отрицательного результата 89,3 %, индекс точности 92 %.

5. Определены наиболее значимые электрические, вязкоупругие параметры эритроцитов для дифференцирования стеатогепатита и стеатоза при жировой болезни печени: амплитуда деформации на частоте 10⁶ Гц ($p = 0,0003$); дипольный момент ($p = 0,009$); емкость мембран ($p = 0,014$); поляризуемость клеток на частоте 106 Гц ($p = 0,03$); обобщенные показатели вязкости ($p = 0,006$), жесткости ($p = 0,005$); электропроводность ($p = 0,008$) (при создании комплексной модели – AUC 0,904, чувствительность 0,9, специфичность 0,83).

6. Установлены различия в наборе параметров, направлениях и сроках изменения свойств эритроцитов в динамике абстинентного синдрома: положение равновесной частоты, поляризуемость на частоте 10⁶ Гц, емкость мембран, дипольный момент, электропроводность, скорость движения к электродам – через месяц воздержания от алкоголя; амплитуда деформации, обобщенные показатели вязкости, жесткости, индексы деструкции, агрегации – к концу третьего месяца абстиненции ($p = 0,004-0,02$). У пациентов с НАЖБП на фоне снижения массы тела на 5–7% за период 3 месяца выявлены статистически незначимые изменения некоторых параметров эритроцитов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Пациентам с жировой болезнью печени целесообразно исследовать электрические и вязкоупругие параметры эритроцитов как дополнительные неинвазивные биомаркеры с целью:

- а) уточнения этиологии заболевания;
- б) выявления индуцированных интенсивным употреблением алкоголя изменений в организмах лиц, профессия которых сопряжена с повышенным уровнем опасности (водители, диспетчеры, пилоты и др.);
- в) уточнения степени некровоспалительной активности в печени для раннего выбора адекватной терапии, определении акцентов при ведении пациентов – воздержание от алкоголя, коррекция метаболического синдрома;

б) мониторинга за течением заболевания для своевременной коррекции назначенного лечения и достижения конечных целей (объективизация состояния абстиненции, улучшение реологических параметров эритроцитов на фоне снижения выраженности проявлений метаболического синдрома).

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Кручинина М.В., Паруликова М.В., Курилович С.А., Громов А.А., Генералов В.М. Изменение параметров эритроцитов у пациентов с жировой болезнью печени алкогольного и неалкогольного генеза в динамике абстинентного синдрома и снижения массы тела // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2017. – №9. – Выпуск 145. – С. 106–115.

2. Кручинина М.В., Паруликова М.В., Громов А.А., Генералов В.М., Генералов К.В., Кручинин В.Н., Рыхлицкий С.В., Кручинина Э.В., Шувалов Г.В. Острое воздействие этанола на эритроциты *in vitro*: новый подход к дифференциальной диагностике жировой болезни печени. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2019; 172(12): 122–134. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-172-12-122-134

3. Кручинина М.В., Паруликова М.В., Курилович С.А., Громов А.А., Генералов В.М., Кручинин В.Н., Рыхлицкий С.В., Шестов А.А. Возможности метода диэлектрофореза эритроцитов в дифференцировании жировой болезни печени алкогольного и неалкогольного генеза у мужчин // Атеросклероз. – 2020. – Т. 16, N 4. – С. 27–42. DOI: 10.15372/ATER20200404

4. Кручинина М.В., Паруликова М.В., Белковец А.В., Громов А.А. Возможности использования электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов для диагностики стеатогепатита у пациентов с жировой болезнью печени. РМЖ. Медицинское обозрение. 2023;7(5):249-257. DOI: 10.32364/2587-6821-2023-7-5-2.

5. Кручинина М.В., Белковец А.В., Паруликова М.В., Громов А.А. Жировая болезнь печени смешанного генеза: особенности электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов. Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия: Естественные и технические науки. 2023. – № 9. – С. 185–196. DOI 10.37882/2223-2982.2023.09.13

6. Кручинина М.В., Осипенко М.Ф., Паруликова М.В., Громов А.А. Электрические и вязкоупругие параметры эритроцитов в составе диагностических моделей для дифференцирования жировой болезни печени смешанного генеза от неалкогольной и алкогольной жировой болезни печени. Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2024;34(3):38–52. <https://doi.org/10.22416/1382-4376-2024-1215-3218>

7. Кручинина М.В., Осипенко М.Ф., Паруликова М.В., Белковец А.В., Кручинина Э.В. Диагностические модели для дифференцирования жировой болезни печени алкогольного и неалкогольного генеза. Медицинский совет. 2024;18(15):82–95. <https://doi.org/10.21518/ms2024-397>.

8. Патент № 2697202 (РФ) Способ дифференциальной диагностики жировой болезни печени алкогольного и неалкогольного генеза / Кручинина М.В., Генералов В.М., Паруликова М.В., Курилович С.А., Громов А.А., Генералов К.В., Сафатов А.С., Буряк Г.А., Шувалов Г.В. // Бюл. 2019. № 23.

9. Генералов К.В., Кручинина М.В., Сафатов А.С., Генералов В.М., Буряк Г.А., Громов А.А., Паруликова М.В., Шувалов Г.В., Кручинина Э.В. Диэлектрофорез в медицине. – Новосибирск: ООО «Офсет-ТМ», 2024. – 200 с. ISBN 978-5-85957-220-5, 500 экз., 12,5 печ. листов

10. Свидетельство о государственной регистрации базы данных №2024621728 Российская Федерация. «Биомаркеры жировой болезни печени различного генеза (БЖБПРГ)», заявка № 2024620789, дата регистрации 19.04.2024 – Кручинина М.В., Паруликова М.В., Белковец А.В., Кручинина Э.В.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

| | | | |
|------|------------------------------------|---------|---|
| АБП | алкогольная болезнь печени | НАЖБП | неалкогольная жировая болезнь печени |
| АЛТ | аланинаминотрансфераза | НАСГ | неалкогольный стеатогепатит |
| АЖБП | алкогольная жировая болезнь печени | ОХС | общий холестерин |
| АСТ | аспартатаминотрансфераза | ТГ | триглицериды |
| ГГТП | гамма-глутамилтранспептидаза | ЩФ | щелочная фосфатаза |
| ДЭФ | диэлектрофорез | АУС | область под кривой |
| ЖБП | жировая болезнь печени | СИ (ДИ) | доверительный интервал |
| ЛПВП | липопротеины высокой плотности | МСУ | средний корпускулярный объем эритроцита |