



DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-172-12-122-134

Острое воздействие этанола на эритроциты *in vitro*: новый подход к дифференциальной диагностике жировой болезни печени

Кручинина М. В.^{1,4}, Паруликова М. В.¹, Громов А. А.¹, Генералов В. М.², Генералов К. В.², Кручинин В. Н.³, Рыхлицкий С. В.³, Кручинина Э. В.⁴, Шувалов Г. В.⁵

¹ Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины — филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, 630089, Россия

² Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, пос. Кольцово, Новосибирская область, 630559, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физики полупроводников им. А. В. Ржанова Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090, Россия

⁴ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет», Новосибирск, 630091, Россия

⁵ Федеральное государственное унитарное предприятие «Сибирский государственный ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский институт метрологии», Новосибирск, 630004, Россия

Acute ethanol effect on erythrocytes *in vitro*: a new approach to differential diagnostics of fatty liver disease

M. V. Kruchinina^{1,4}, M. V. Parulikova¹, A. A. Gromov¹, V. M. Generalov², K. V. Generalov², V. N. Kruchinin³, S. V. Rykhlikskii³, E. V. Kruchinina⁴, G. V. Shuvalov⁵

¹ Research Institute of Internal and Preventive Medicine — Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630089, Russia

² State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk region, 630559, Russia

³ Rzhanov Institute of Semiconductor Physics Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090, Russia

⁴ Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, 630091, Russia

⁵ Siberian State Order of the Red Banner of Labor Institute of Metrology, Novosibirsk, 630004, Russia

Для цитирования: 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

For citation: Kruchinina M. V., Parulikova M. V., Gromov A. A., Generalov V. M., Generalov K. V., Kruchinin V. N., Rykhlikskii S. V., Kruchinina E. V., Shuvalov G. V. Acute ethanol effect on erythrocytes *in vitro*: a new approach to differential diagnostics of fatty liver disease. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2019;172(12): 122–134. (In Russ.) DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-172-12-122-134

✉ **Corresponding author:**

**Кручинина
Мargarita Vital'evna**
Margarita V. Kruchinina
kruchmargo@yandex.ru

Кручинина Маргарита Витальевна, д.м.н., ведущий научный сотрудник, лаборатория гастроэнтерологии; доцент кафедры пропедевтики внутренних болезней

Паруликова Марина Владимировна, соискатель ученой степени кандидата наук; врач-гастроэнтеролог, заведующая отделением гастроэнтерологии

Громов Андрей Александрович, к.м.н., старший научный сотрудник, руководитель группы исследования гемостаза лаборатории клинических биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний

Генералов Владимир Михайлович, д.т.н., ведущий научный сотрудник отдела биофизики и экологических исследований

Генералов Константин Владимирович, инженер-программист отдела информационных технологий

Кручинин Владимир Николаевич, к.х.н., научный сотрудник, лаборатория эллипсометрии

Рыхлицкий Сергей Владимирович, к.т.н., заведующий лабораторией эллипсометрии

Кручинина Элина Владимировна, студентка 3 курса

Шувалов Геннадий Владимирович, к.т.н., директор Института

Margarita V. Kruchinina, DSc, Leading Researcher, Laboratory of Gastroenterology; Assistant Professor of Department of Internal Medicine Propaedeutics; *Scopus ID: 25646427600, ORCID: 0000-0003-0077-3823*

Marina V. Parulikova, PhD student; Gastroenterologist, Head of the Hospital Gastroenterology Department
Scopus ID: 8505860800

Andrey A. Gromov, PhD in medicine, Senior Researcher, Hemostasis Research Team Leader at Laboratory of Clinical Biochemical and Hormone Research for Internal Diseases; *Scopus ID: 38561373900*

Vladimir M. Generalov, DSc, Leading Researcher, Department of Biophysic and Ecologic Researching; *Scopus ID: 6602676399*

Konstantin V. Generalov, Programmer at Information Technology Department; *Scopus ID: 56848292100*

Vladimir N. Kruchinin, PhD in Chemistry, Researcher, Laboratory of Ellipsometry; *Scopus ID: 7003825156, ORCID: 0000-0002-9905-9031*

Sergey V. Rykhlytskii, PhD in Technics, Head of Laboratory of Ellipsometry; *Scopus ID: 6506532849*

Elina V. Kruchinina, 3rd year student

Gennadiy V. Shuvalov, PhD in Technics, Director of Institute; *Scopus ID: 8260467700*

Резюме

Цель работы — изучить различия изменений вязкоупругих параметров эритроцитов (амплитуды деформации, обобщенных показателей вязкости, жесткости) в динамике взаимодействия с этанолом in vitro у пациентов с не-алкогольной (НАЖБП) и алкогольной жировой болезнью печени (АЖБП) для использования в дифференциальной диагностике.

Материалы и методы. Обследованы 50 мужчин, 24 — с НАЖБП (46,5±1,5 лет), 26 — с АЖБП (48,6±1,2 года). Исследование вязкоупругих параметров эритроцитов проведено методом диэлектрофореза с помощью электрооптической системы детекции клеток. В динамике эксперимента оценены уровни показателей эритроцитов до и после экспозиции in vitro в течение 300 с 10 мкл 0,02% раствора этанола.

Результаты. У пациентов с НАЖБП после экспозиции с этанолом выявлено снижение амплитуды деформации эритроцитов на фоне увеличения обобщенных показателей вязкости и жесткости, напротив, у больных с АЖБП отмечено увеличение способности к деформации эритроцитов со снижением обобщенных вязкости и жесткости ($p < 0,01-0,05$). Инверсная реакция клеток на экспозицию с этанолом позволила различить пациентов с жировой болезнью печени различного генеза с чувствительностью 87,5%, специфичностью 96,2%, прогностической ценностью положительного — 95,4% и отрицательного — 89,3% результатов, а также индексом точности 92%. Предложенный метод различения жировой болезни печени различного генеза является перспективным в связи с простотой, высокой пропускной способностью и низкой затратностью.

Ключевые слова: жировая болезнь печени, алкогольный и неалкогольный генез, диагностика, эритроциты, острое воздействие этанола in vitro

Summary

The aim of the work is to study the differences in changes in the viscoelastic parameters of erythrocytes (amplitude of deformation, summarized viscosity and summarized rigidity) in the dynamics of interaction with ethanol in vitro in patients with non-alcoholic (NAFLD) and alcoholic (AFLD) fatty liver disease for use in differential diagnostics.

Materials and methods. 50 men were examined, 24 — with NAFLD (46.5±1.5 years), 26 — with AFLD (48.6±1.2 years). The study of viscoelastic parameters of erythrocytes was carried out by dielectrophoresis with an electro-optical cell detection system. The levels of erythrocytes were evaluated before and after in vitro exposure for 300 s with 10 µl of a 0.02% ethanol solution in the dynamics of the experiment.

Results. In erythrocytes of patients with NAFLD after exposure with ethanol, a decrease in strain amplitude was revealed against the background of an increase in summarized viscosity and summarized rigidity, on the contrary, in erythrocytes in patients with AFLD, an increase in the ability to deform was observed with a decrease in generalized viscosity and rigidity ($p < 0.01-0.05$). Inverse reaction of cells to ethanol exposure allowed to distinguish patients with fatty liver disease of various origins with sensitivity of 87.5%, specificity of 96.2%, predictive value of positive — 95.4% and negative — 89.3%, as well as an accuracy of 92%.

The proposed method for distinguishing fatty liver disease of various origins is promising due to its simplicity, high throughput and low cost.

Keywords: fatty liver disease, alcoholic and non-alcoholic genesis, diagnosis, erythrocytes, acute with exposure to ethanol in vitro

Жировая болезнь печени (ЖБП) включает алкогольный (АЖБП) и неалкогольный (НАЖБП) генез заболевания. Первый связан с употреблением пациентами этанола в гепатотоксических дозах, второй, в основном, ассоциирован с метаболическим синдромом (МС) [1]. Несмотря на совпадение большей части метаболических путей АЖБП и НАЖБП, течение, прогноз и подходы в лечении заболевания различны, что определяет важность дифференциальной диагностики ЖБП, особенно на ранних этапах развития [2, 3].

В настоящее время в диагностике жировой болезни широко используются результаты методик: биопсия печени, ультразвуковое исследование, лабораторные показатели эритроцитов, биохимические тесты.

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

Ультразвуковое исследование (УЗИ) печени с применением специальной аппаратуры помимо размеров, структуры, характера паренхимы позволяет определить степень жировой инфильтрации и фиброза. Ультразвуковая эластометрия с помощью аппарата *FibroScan* позволяет оценить *Controlled Attenuation Parameter (CAP™)* – контролируемый параметр затухания, который используется для неинвазивной оценки и количественного определения стеатоза. Несмотря на большой объем и оперативность получаемой информации, методы ультразвукового исследования не позволяют дискриминировать алкогольное и неалкогольное поражение печени.

В диагностике хронического потребления алкоголя среди лабораторных показателей эритроцитов рассматривают: увеличение среднего корпускулярного объема, повышенный уровень триангулоцитов, появление в мембранах клеток красной крови аномального фосфолипида – фосфатидилэтанола. Изменение этих параметров, однако, не является специфичным для жировой болезни печени алкогольного генеза [4–6].

Биохимические тесты для диагностики АЖБП и НАЖБП основаны на методах, различных в зависимости от этиологии процесса:

- метод, основанный на наличии сопутствующих биохимических нарушений, в частности, липидного, углеводного обмена. К ним относятся *FibroTest*, *FibroMaxTest*, *Fibrometer*. Так, в составе ФиброМакс имеется ряд неинвазивных тестов, позволяющих выявить наличие стеатогепатита (СтеатоТест), его неалкогольную (НешТест) и алкогольную (АшТест) формы [7];
- метод СтеатоСкрин, позволяющий подтвердить или опровергнуть стеатоз печени, установленный по результатам УЗИ, а также выявить признаки стеатоза печени у лиц группы высокого риска. Для данного метода исследована корреляция с гистологическими признаками стеатоза печени, что позволяет использовать его неинвазивно и с высокой степенью достоверности на наличие стеатоза печени у пациентов [8, 9].

Таким образом, недостатками всех выше указанных методов являются высокая трудоемкость и стоимость, малая доступность оборудования, необходимость специального обучения персонала, необходимость применения широкой номенклатуры различных реагентов. Эти факторы затрудняют использование данных методов для массовой диагностики в целях скрининга. Кроме того, диагностическая точность зачастую зависит от выраженности синдромов гемолиза, цитолиза, холестаза, наличия у пациента сопутствующей инфекции, что может сказаться на уровне исследуемых биохимических показателей и затруднить интерпретацию результата в плане дифференциальной диагностики АЖБП и НАЖБП.

Проведенные ранее исследования показали чувствительность вязкоупругих параметров клеток красной крови к целому ряду факторов и соединений, включая этанол [10, 11], при этом в ряде работ продемонстрировано различие эффектов острого и хронического влияния алкоголя на эритроциты [12, 13]. Данная информация легла в основу гипотезы, предполагающей различную реакцию (изменение вязкоупругих параметров) клеток красной крови в ответ на острое воздействие этанола *in vitro* у лиц, не потребляющих алкоголь, и у пациентов с хроническим потреблением алкоголя, при котором происходит модификация структурно-функциональных свойств эритроцитов.

Цель работы – изучить различия изменений вязкоупругих параметров эритроцитов (амплитуды деформации, обобщенных показателей вязкости, жесткости) у пациентов с неалкогольной и алкогольной жировой болезнью печени для использования в дифференциальной диагностике.

Материалы и методы

Обследованы 50 мужчин: 24 – с НАЖБП (46,5±1,5 лет), 26 – с АЖБП (48,6±1,2 лет). 14 пациентов (58,3%) с НАЖБП отрицали факт употребления алкоголя в прошлом и настоящем по религиозным и этическим причинам, оставшиеся 10 человек (41,7%)

употребляли алкоголь не чаще 1–3 раз в год в дозах, не превышающих 20 г в пересчете на чистый этанол.

Пациенты с АЖБП были обследованы на 8,5±1 день абстиненции, при этом последняя принятая доза алкоголя составила 96,2±5,6 г в пересчете

на чистый этанол (от 40 до 200 г). Частота потребления алкоголя у большей части пациентов с АЖБП (18 человек – 69,2%) соответствовала 2–3 разам в неделю, оставшиеся 30,8% употребляли алкогольные напитки ежедневно. При этом разовая доза алкоголя в среднем составляла $85,2 \pm 3,4$ г, варьируя от 40 до 110 г, а недельная доза – $443,1 \pm 33,2$ г (от 110 до 810 г) в пересчете на чистый этанол.

Диагноз верифицирован на основании клинического, биохимического и инструментального исследований, включая ультрасонографическое, непрямую эластометрию, а также анкеты, уточняющие режим потребления алкоголя. Ультразвуковое исследование и компьютерная томография позволили верифицировать наличие гепатомегалии, признаков стеатоза у всех пациентов; косвенная оценка степени фиброза печени у большинства обследуемых была как умеренная, признаки формирования портальной гипертензии отсутствовали. С помощью не прямой эластометрии печени (Фиброскан FS-502, ECHOSENS, Франция) установлена степень фиброза F0-F1 у всех обследуемых. Вирусная этиология заболевания исключена на основании отсутствия серологических маркеров и (или) ДНК и РНК вирусов методами иммуноферментного анализа (ИФА) и полимеразной цепной реакции (ПЦР). Алкогольный генез стеатоза устанавливался по данным достоверно подтвержденного наличия систематического потребления алкоголя в настоящее время и в анамнезе (по данным стандартного опроса, в том числе с помощью CAGE-опросника, AUDIT).

Исследование одобрено Этическим Комитетом Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательского института терапии и профилактической медицины» (протокол заседания № 122 от 29.11.2016). Все обследуемые дали информированное согласие на

участие в работе в соответствии с Хельсинской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266.

Исследование вязкоупругих параметров эритроцитов проведено методом диэлектрофореза с помощью системы электрооптической детекции клеток [10, 14]. Забранную натошак вакутейнерами кровь (2 мл) помещали в 3,9% цитратный буфер в соотношении 9:1; через 5 мин. 10 мкл пробы вносили в 0,3 М раствор сахарозы объемом 290 мкл и перемешивали. Полученную клеточную суспензию (10 мкл) вносили в измерительную камеру для проведения измерений [14].

Оценивались параметры: амплитуда деформации эритроцитов под действием неоднородного переменного электрического поля [м], обобщенный показатель вязкости [Па·с] и обобщенный показатель жесткости [Н/м]. Анализ параметров проводился в динамике: исследовались базовые уровни этих показателей, а затем – их уровни после экспозиции взвесей эритроцитов с 10 мкл 0,02% раствора этанола в течение 300 с (соответствует физиологически приемлемым низким концентрациям этанола при приеме *per os* по данным Oonishi T, Sakashita K. (2000) [15].

Для статистического анализа применено программное обеспечение SPSS, ver.17. Для попарного сравнения групп был использован непараметрический U-критерий Манна-Уитни, поскольку распределение выборок переменных было отлично от нормального. Связи между признаками оценивались с помощью парциального корреляционного анализа. Во всех процедурах статистического анализа критический уровень значимости нулевой гипотезы (p) принимался равным 0,05.

Результаты

Клинико-биохимическая характеристика пациентов обеих групп представлена в таблице 1.

Из данных таблицы 1 следует, что у пациентов с НАЖБП выявлены признаки метаболического синдрома в соответствии с рекомендациями экспертов Всероссийского научного общества кардиологов по диагностике и лечению метаболического синдрома (Второй пересмотр, 2009) [16], включая висцеральное ожирение, артериальную гипертензию, дислипидемию, инсулинорезистентность.

Вместе с тем, и у большинства пациентов с АЖБП выявлено наличие артериальной гипертензии, гипертриглицеридемии, гиперхолестеринемии, установлены повышенные уровни инсулина, глюкозы крови, мочевой кислоты, отмечена избыточная масса тела, что отражает, вероятно, сходные звенья патогенеза НАЖБП и АЖБП. У пациентов с НАЖБП достоверно чаще отмечены случаи сахарного диабета 2 типа, оказалась больше окружность талии, ИМТ ($p < 0,01$). У больных с АЖБП оказались достоверно выше уровни активности ГГТП, АЛТ, АСТ с преобладанием последней (коэффициент

де Ритиса более 1), ХС ЛПВП, сывороточного железа ($p < 0,01-0,05$), чем при неалкогольном генезе заболевания, что, вероятно, является отражением хронической алкоголизации. Однако, значения этих показателей не выходили за пределы референтных значений, что создало сложности в дифференциальной диагностике.

При исследовании эритроцитов методом диэлектрофореза установлено, что у пациентов с НАЖБП амплитуда деформации клеток красной крови на высоких частотах (1×10^6 , $0,5 \times 10^6$ Гц) неоднородного переменного электрического поля (НПЭП) достоверно выше, а обобщенные показатели вязкости и жесткости ниже, чем у больных с АЖБП (рис. 1, табл. 2). После экспозиции с раствором этанола происходило изменение вязкоупругих параметров клеток красной крови, но по-разному в группах, отличных по этиологии процесса. При наличии неалкогольной жировой болезни печени способность эритроцитов к деформации после воздействия этанола достоверно снижалась, а в случае алкогольной – повышалась ($p < 0,01$).

Таблица 1.

Клинико-биохимические показатели у пациентов с НАЖБП и АЖБП (M±m).

Примечание:

M – среднее значение, m – средняя ошибка средней арифметической величины; ^ – достоверность (p) отличия от группы с НАЖБП (^ – p<0,05, ^^ – p<0,01).

Table 1.

Clinical and biochemical parameters in patients with NAFLD and AFLD (M±m).

Note:

M is the average value, m is the average error of the arithmetic average value; ^ – reliability (p) of differences from the group with NAFLD (^ – p < 0.05, ^^ – p < 0.01).

Показатели	Группа пациентов с НАЖБП n=24	Группа пациентов с АЖБП n=26
Артериальная гипертензия,%	83,3	76,9
Сахарный диабет 2 типа,%	54,2	23,1^^
Гипертриглицеридемия,%	41,7	38,5
Индекс массы тела, кг/м ²	30,6 ± 2,1	26,2 ± 1,9^^
Окружность талии, см	108 ± 7,2	90 ± 5,9^^
Инсулин сыворотки, мкЕд./мл	28,4 ± 3,7	25,7 ± 2,9
Общий холестерин, мг/дл	241,4 ± 6,8	204,5 ± 7,1 ^
Холестерин ЛПВП, мг/дл	39,9 ± 1,8	53,4 ^ ± 1,7
Холестерин ЛПНП, мг/дл	168,4 ± 3,1	140,2 ± 2,9^^
Триглицериды, мг/дл	237,9 ± 12,7	222,5 ± 10,7
Глюкоза крови натощак, ммоль/л	6,5 ± 0,5	6,1 ± 0,4
Общий белок, г/л	72,2 ± 1,1	70,6 ± 0,9
Альбумин, г/л	45,2 ± 0,7	43,7 ± 1,1
АЛТ, Ед./л	25,3 ± 2,7	37,2 ± 3,3 ^^
АСТ, Ед./л	24,1 ± 3,6	39,7 ± 4,5^^
АСТ/АЛТ	0,84 ± 0,11	1,08 ± 0,12
ГГТП, Ед./л	30,1 ± 4,9	53,2 ± 5,8^^
ЩФ, Ед./л	162,4 ± 9,7	173,5 ± 10,1
Общий билирубин, мкмоль/л	11,8 ± 1,9	18,0 ^ ± 2,0
Прямой билирубин, мкмоль/л	4,1 ± 0,9	5,8 ± 1,2
Мочевая кислота, мг/дл	435,9 ± 22,1	338,7 ± 19,5
Креатинин, мкмоль/л	73,2 ± 3,7	85,9 ± 3,3
Мочевина, ммоль/л	6,6 ± 1,9	6,4 ± 2,1
Железо сыворотки, мкмоль/л	15,1 ± 1,9	22,1 ^ ± 2,2

Таблица 2.

Вязкоупругие параметры эритроцитов у пациентов с алкогольной и неалкогольной жировой болезнью печени до и после экспозиции с раствором этанолом (M+m).

Примечание:

M – среднее значение, m – средняя ошибка средней арифметической величины;

* – статистическая значимость (p) отличия от группы с НАЖБП (* – p < 0,05, ** – p < 0,01);

^ – статистическая значимость (p) отличия начальных значений показателей от значений таковых после экспозиции с раствором этанола (^ – p < 0,05, ^^ – p < 0,01).

Table 2.

Viscoelastic parameters of erythrocytes in patients with alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease before and after exposure to a solution of ethanol (M + m)

Note:

M is the average value, m is the average error of the arithmetic average value;

* – statistical significance (p) differences from the group with NAFLD (* – p < 0.05, ** – p < 0.01);

^ – statistical significance (p) of the differences between the initial values of the indicators and the values of those after exposure to ethanol solution (^ – p < 0.05, ^^ – p < 0.01).

Группы	Группа пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени (НАЖБП) (n=24)	Группа пациентов с алкогольной жировой болезнью печени (АЖБП) (n=26)
Средняя амплитуда деформации в выборке эритроцитов начальная M1, [м]	4,3E-06 ± 1,4E-07	3,2E-06 ± 1,4E-07*
Средняя амплитуда деформации в выборке эритроцитов после экспозиции с раствором этанола M2, [м]	3,1E-06 ± 1,6E-07^	4,4E-06 ± 1,4E-07*^
Разница средних M1-M2	1,2E-06	-1,2E-06
2 × Корень(m ² + m ²)	4,3E-07	4,0E-07
Обобщенный показатель вязкости (начальный) ×10 ⁻¹ , [Па·с] h1	6,11 ± 0,70	7,52 ± 0,62**
Обобщенный показатель вязкости (после экспозиции с раствором этанола) ×10 ⁻¹ , [Па·с] η2	7,73 ± 0,57^^	6,25 ± 0,57*^
Разница средних η1 – η2	-1,62E-01	1,27E-01
Обобщенный показатель жесткости (начальный) ×10 ⁻⁶ , [Н/м] C1	6,87 ± 1,21	9,47 ± 1,34**
Обобщенный показатель жесткости (после экспозиции с раствором этанола) ×10 ⁻⁶ , [Н/м] C2	8,15 ± 1,84^^	7,55 ± 1,61*^^
Разница средних C1-C2	-1,28E-06	1,92E-06

При рассмотрении изменения показателей обобщенной жесткости и вязкости в ходе проведения эксперимента выявилась динамика, инверсная таковой для амплитуды деформации клеток: у пациентов с НАЖБП после экспозиции с раствором этанола обобщенные показатели жесткости и вязкости нарастают, а при наличии АЖБП – снижались (p<0,01–0,05). Таким образом, при наличии НАЖБП разница средних значений обобщенных

показателей жесткости (C1-C2) и вязкости (η1 – η2) значима и отрицательна, а в случае АЖБП – положительна (таблица 2).

Выявлены прямые корреляции этиологии жировой болезни печени с обобщенными показателями вязкости (r=0,592, p<0,0001) и жесткости (r=0,567, p<0,0001) и обратные – с амплитудой деформации клеток (r= -0,551, p<0,001), отражая более выраженные сдвиги параметров при алкогольном генезе

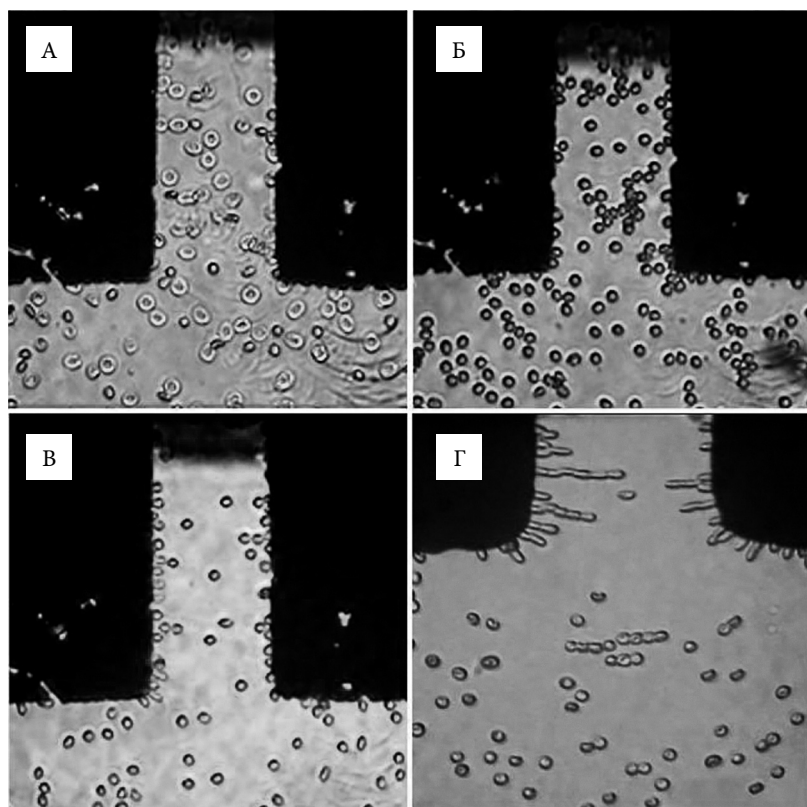


Рисунок 1.

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

Figure 1.

Change in the amplitude of red blood cell deformation upon exposure of 10 μ l of a 0.02% ethanol solution for 300 s: a, b – experiment with erythrocytes of patients with NAFLD; c, d – experiment with erythrocytes of patients with AFLD. a, b – before making a solution of ethanol; b, d – after exposure to ethanol.

Показатели в группе с НАЖБП	Обобщенный показатель вязкости [Па·с]	Обобщенный показатель жесткости [Н/м]	Показатели в группе с АЖБП	Обобщенный показатель вязкости [Па·с]	Обобщенный показатель жесткости [Н/м]
Амплитуда деформации эритроцитов [м]	-0,766 (0,001)	-0,857 (0,0001)	Амплитуда деформации эритроцитов [м]	-0,901 (0,0001)	-0,911 (0,0001)
Обобщенный показатель жесткости [Н/м]	0,896 (0,0001)	-	Обобщенный показатель жесткости [Н/м]	0,940 (0,0001)	-

Таблица 3.

Корреляции вязкоупругих параметров эритроцитов в группах пациентов с жировой болезнью печени различного генеза.

Примечание:

в круглых скобках указан показатель достоверности данного коэффициента корреляции.

Table 3.

Correlations of viscoelastic parameters of erythrocytes in groups of patients with fatty liver disease of various origins.

Note:

in parentheses the confidence index of this correlation coefficient is indicated.

ЖБП. Установлены ассоциации между вязкоупругими параметрами эритроцитов в исследуемых группах (таблица 3), при этом выявлены обратные корреляции между амплитудой деформации и обобщенными показателями вязкости, жесткости и, напротив, тесные прямые связи между последними. Следует отметить, что сила связи между параметрами оказалась несколько выше в группе с АЖБП, чем с НАЖБП.

На основании полученных результатов был предложен дифференциально-диагностический подход для различения алкогольной и неалкогольной жировой болезни печени. При этом в качестве основного параметра принята амплитуда деформации клеток с учетом возможности высокой точности измерения данного показателя (метрологическое обеспечение) [14], принимая во внимание тесную связь этого параметра с обобщенными жесткостью и вязкостью.

Средняя амплитуда деформации (M) в выборке эритроцитов до экспозиции в растворе этанола соответствовала M1, а после экспозиции – M2. В процессе проведения эксперимента сравнивали результаты средней амплитуды деформации двух

независимых выборок с тем, чтобы оценить достоверность разности M1 – M2.

Если эта разность значима и положительна, то средние 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 M1 и M2 относятся к разным генеральным совокупностям, и принимается заключение о высокой вероятности наличия алкогольной жировой болезни печени.

Достоверность разности средних M1 – M2 и предположение о наиболее вероятном генезе жировой болезни печени принимается, согласно выражению (1)

$$M1 - M2 \geq 2 \times \sqrt{m_1^2 + m_2^2} \quad (1)$$

Таким образом, у пациента с алкогольной жировой болезнью печени происходит увеличение амплитуды деформации клеток красной крови после экспозиции с раствором этанола, а у пациента с неалкогольной жировой болезнью печени – напротив, снижение амплитуды деформации.

Таблица 4.

Результаты оценки диагностических возможностей использования амплитуды деформации эритроцитов в эксперименте с этанолом для выявления алкогольной и неалкогольной жировой болезни печени по сравнению с данными клинико-инструментальных методов исследования.

Примечание:

Чувствительность: 21: (21 + 3) x 100% = 87,5%
 Специфичность: 25: (1 + 25) x 100% = 96,2%
 Прогностическая ценность: «+» результата метода: 21: (21 + 1) x 100% = 95,4%
 Прогностическая ценность «-» результата метода: 25: (3 + 25) x 100% = 89,3%
 Индекс точности: (21 + 25) / (21 + 1 + 3 + 25) x 100% = 92%

Table 4.

The results of the evaluation of the diagnostic possibilities of using the erythrocyte deformation amplitude in the experiment with ethanol to identify alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease compared with the data of clinical and instrumental methods of research.

Note:

Sensitivity 21: (21 + 3) x 100% = 87.5%
 Specificity 25: (1 + 25) x 100% = 96.2%
 Predictive value
 «+» Result of method 21: (21 + 1) x 100% = 95.4%
 Predictive value
 «-» the result of method 25: (3 + 25) x 100% = 89.3%
 Index of accuracy (21 + 25) / (21 + 1 + 3 + 25) x 100% = 92%

Результаты использования амплитуды деформации эритроцитов	Результаты клинико-инструментальных методов исследования	
	Группа НАЖБП n = 24 случая	Группа АЖБП n = 26 случаев
Группа НАЖБП n = 22 случая	Истинно положительный Группа НАЖБП n = 21	Ложно положительный Группа АЖБП n = 1
Группа АЖБП n = 28 случаев	Ложно отрицательный Группа НАЖБП n = 3	Истинно положительный Группа АЖБП n = 25

Согласно принципам доказательной медицины [17] проведена оценка возможностей предложенного подхода по определению алкогольного и неалкогольного генеза жировой болезни печени по сравнению с данными совокупных клинико-инструментальных методов исследования (таблица 4).

Обсуждение

Гипотеза настоящего исследования заключалась в предположении различной реакции клеток красной крови на «острое» воздействие этанола *in vitro* в случаях неалкогольного и алкогольного стеатоза печени. Предполагалось, что в эритроцитах пациентов с АЖБП под действием хронического потребления алкоголя происходят существенные структурно-функциональные изменения, что подтверждается целым рядом исследований. Они касаются как структуры мембран эритроцитов (изменение соотношения холестерина к общей фракции фосфолипидов в пользу первого, снижение уровня легкоокисляемых фосфолипидов, появление аномального фосфолипида – фосфатидилэтанола, увеличение содержания насыщенных жирных кислот, в том числе, их этиловых эфиров, экстернализация фосфолипидов внутреннего слоя мембран эритроцитов – фосфатидилсерина, фосфатидилэтаноламина [18–21]; снижение уровня фосфатидилхолина, образование аддуктов этанола, ацетальдегида с белками мембран эритроцитов [22]), так и внутреннего содержимого клеток (нарастание деструктуризации гемоглобина, появление «сшивок» его компонентов с внутренним слоем мембран, увеличение участков неокислительного взаимодействия этанола и ацетальдегида с гемоглобином с накоплением аддуктов [23, 24]).

Вышеописанные сдвиги приводят к снижению способности клеток красной крови к деформации [11, 14, 18].

Определенный вклад в изменение деформируемости эритроцитов вносят K⁺ (Ca²⁺)-каналы этих клеток [25]. У больных, злоупотребляющих алкоголем, в состоянии абстиненции амплитуда гиперполяризационного ответа эритроцитов на добавку Ca²⁺-ионофора A23187 (АЕ), являющаяся интегральной характеристикой оперирования Ca²⁺-активируемых K⁺-каналов [26, 27], значительно увеличена по сравнению с контрольными значениями. Поскольку известно, что гиперполяризация мембраны клеток в подобных условиях обусловлена открыванием K⁺(Ca²⁺)-каналов и выходом ионов калия [28], полученные результаты свидетельствуют об увеличении Ca²⁺-зависимой

Она демонстрирует достаточно высокие значения чувствительности (87,5%) и специфичности (96,2%), прогностической ценности положительного (95,4%) и отрицательного результата (89,3%), а также индекса точности (92%).

K⁺-проницаемости мембран эритроцитов больных. Подобные изменения непременно должны сказаться на способности эритроцитов к деформации (величине амплитуды деформации под действием НПЭП) и тесно связанных с вышеописанными сдвигами значениях обобщенных показателей вязкости и жесткости.

У пациентов с НАЖБП на фоне проявлений метаболического синдрома также наблюдаются изменения в состоянии клеток красной крови. Так, известно, что инсулинорезистентность у пациентов с метаболическим синдромом влияет на вязкоупругие параметры эритроцитов (показано, что С-пептид проинсулина у таких больных снижает деформируемость клеток, изменяет их форму через воздействие на Na⁺, K⁺-АТФазу мембран эритроцитов [29]), конформационные изменения гликозилированного гемоглобина на фоне частых и длительных эпизодов гипергликемии определяют увеличение «внутренней жесткости» эритроцитов [30], атерогенная дислипидемия приводит к модификации мембран эритроцитов [31], поскольку известна способность эритроцитов адсорбировать на своей поверхности липопротеиды плазмы крови, нагруженные холестерином (в форме ЛПОНП, ЛПВП и ЛПНП) [32].

Но очевидно, хроническое влияние этанола оказывается более значимым для уровня вязкоупругих параметров эритроцитов, чем имеющиеся метаболические сдвиги. Тем более, что хронический прием алкоголя ассоциирован с изменениями в липидном профиле, сопровождается повышением уровня глюкозы, мочевой кислоты, развитием инсулинорезистентности [33].

В итоге, у пациентов с АЖБП воздействие этанола на клетки красной крови усугубляется имеющимися метаболическими сдвигами, т.е. эффект оказывается более выраженным. Как итог, в настоящем исследовании изначально амплитуда деформации эритроцитов у пациентов с АЖБП оказалась достоверно ниже, а обобщенные вязкость и жесткость – выше, чем в случаях с НАЖБП.

Следует отметить, что показатель обобщенной жесткости клетки предполагает ее способность

восстанавливать свою форму после воздействия внешних сил (эффект сжатой пружины) и величина этого показателя зависит как от свойств мембраны эритроцита, так и его внутреннего содержимого – гемоглобина. Показатель обобщенной вязкости определяется степенью трения различных слоев клетки между собой, т.е. зависит от свойств всего объема клетки.

Обобщенный показатель жесткости клетки [Н/м] определяется из формулы:

$$c = \frac{a_{\text{кл}} \times \epsilon_0 \times E^2}{4 \times r \times A}$$

где: $a_{\text{кл}}$ – поляризуемость клетки, [м³];

A – амплитуда деформации клетки, [м] (определяется экспериментально);

r – радиус клетки, [м] (определяется экспериментально);

E – напряженность электрического поля, [В/м] (расчетная величина).

Обобщенный показатель вязкости клетки [Па·с] вычисляется в виде:

$$\eta_c = \frac{c \times t}{6 \times \pi \times r \times \ln(\Delta x/A)},$$

Δx – мгновенная амплитуда деформации клетки [м]

t – время затухания амплитуды деформации [с].

Мгновенная амплитуда деформации (Δx) вычисляется как разница радиусов клетки в деформированном r_{max} и в спокойном состоянии (r) $\Delta x = r_{\text{max}} - r$.

Из указанных выше параметров поляризуемость клетки характеризует уровень ее адаптации к динамично меняющимся внешним условиям (в том числе, воздействию этанола, метаболитов). Величина поляризуемости клетки характеризует способность атомов, ионов, молекул формировать индуцированный дипольный момент, отражает химический состав, пространственное распределение электрических зарядов, энергию связей между ними и средой, в которой она находится и к которой адаптируется. Поляризуемость не зависит от напряженности внешнего электрического поля. Описание каждого в отдельности эритроцита по признаку поляризуемости указывает на присущую ему химическую, структурную, функциональную и, как следствие, биологическую уникальность [10, 14].

Поэтому, посредством изменения показателя поляризуемости реализуется токсическое действие этанола, метаболитов на клетки с последующими сдвигами параметров жесткости и вязкости.

Этанол – мембранотропное соединение, он растворяется в липидном бислое мембран и нарушает их функции. Это негативно отражается на трансмембранном переносе веществ, межклеточных контактах, взаимодействиях рецепторов клетки с сигнальными молекулами [34–36]. Известно, что этанол проникает через мембрану эритроцитов очень быстро [37]. Так, в работе [38] установлено, что проницаемость мембран эритроцитов для этанола составила $2,1 \times 10^{-3}$ см·с⁻¹, она не зависела от концентрации алкоголя (1–500 мМ), проникновение в клетку происходило преимущественно через липидный бислой мембраны, при этом, проницаемость для неэлектролита определялась как

растворимостью в липидах, так и коэффициентом диффузии соединения в мембране.

У непьющих пациентов с НАЖБП действие этанола, возможно, снижает активность или блокирует переносчик глюкозы на мембране (это гликопротеин): посредством действия на микроокружение, вызывает изменение липидной асимметрии. В результате значительно снижается гликолиз в клетке, который является метаболическим процессом, в ходе него в результате субстратного фосфорилирования образуется АТФ [39]. Снижение содержания АТФ в эритроцитах приводит к ряду нарушений, в том числе, к блокированию ионных насосов и нарушению ионного баланса в системе среда-клетка. Это способствует снижению соотношения площади поверхности к объему эритроцитов и превращению клеток в трудно деформируемые сферы [40].

Кроме действия на переносчик глюкозы (спирт ингибирует транспорт глюкозы, который опосредуется носителем белковой полосой 4.5 на мембранах эритроцитов), вероятно, непосредственное действие этанола на Na⁺, K⁺, Mg²⁺-зависимую АТФ-азу эритроцитов – трансмембранный белок – как прямо, так и через микроокружение. В ходе чего Na⁺ перестает откачиваться из клетки, происходит ее набухание [41].

Кроме того, показано действие этанола на активность внутриклеточного фермента – глюкозо-6-дегидрогеназы [42].

Наиболее интересен факт различного поведения клеток в эксперименте *in vitro* с раствором этанола: эритроциты, адаптированные к хроническому воздействию этанола у пациентов с АЖБП, находящихся в состоянии абстиненции, демонстрируют повышение способности к деформации со снижением обобщенных вязкости и жесткости после экспозиции с физиологическими низкими дозами этанола; в то же время, эритроциты непьющих с НАЖБП с метаболическими нарушениями реагируют на этанол значительным снижением амплитуды деформации на фоне увеличения показателей жесткости и вязкости.

Поскольку экспозиция с раствором этанола была кратковременна, можно предположить, что наблюдался эффект воздействия самого этанола, а не его метаболита – ацетальдегида (для его образования требуется более длительная инкубация с этанолом). Данные литературы свидетельствуют, что даже более длительное действие этанола и ацетальдегида *in vitro* не приводит к каким-либо изменениям уровня карбонилирования эритроцитарных белков, но индуцирует процесс кросс-линкинга эритроцитарных белков [43]. Поэтому в течение 300 сек наиболее вероятно действие этанола на липиды клеточной мембраны и неокислительное взаимодействие с ее компонентами.

Na⁺, K⁺, Mg²⁺-зависимая АТФ-аза является мембрано-связанным ферментом, активность которого в значительной степени зависит как от физического состояния липидного окружения, так и от электролитного состава окружающей мембрану жидкости. В норме электролитный состав плазмы крови и цитоплазматической жидкости сбалансирован. При хронической алкоголизации

водно-солевой баланс нарушается, изменяются как вне-, так и внутриклеточные концентрации калия, натрия, кальция, магния. Ранее показано, что хроническое воздействие этанола на организм человека приводит к упорядочению структуры клеточных мембран, что обуславливает снижение их текучести и увеличение устойчивости к дезорганизующему действию этанола [19]. По данным ряда исследователей, активность Na^+ , K^+ -АТФ-азы эритроцитов у лиц, злоупотребляющих алкоголем, в период абстиненции повышена, достоверно отличаясь от таковой здоровых доноров, поскольку мембрана клеток красной крови исходно находится в другом физическом состоянии [44, 45].

Можно предположить, что у пациентов с АЖБП, находящихся в состоянии абстиненции, принимая во внимание «встроенность этанола» в метаболические пути (в частности, повышение активности внутриэритроцитарной каталазы, которая метаболизирует этанол до ацетальдегида [46, 47]), в том числе, энергетический обмен, наблюдается определенный дефицит субстрата – этанола. Действие низких концентраций и краткого времени инкубации с этанолом у этих лиц частично «восполняет» имеющийся дефицит, возобновляет имеющиеся метаболические пути, и, видимо, приводит к повышению активности мембрано-связанных ферментов, гидролизующих внутриклеточную АТФ [48]. Не исключена возможность реализации механизма повышения гидрофобного объема биомембран (ассоциированного с поляризуемостью клеток), что, вероятно, приводит к ускорению перехода фермента, являющегося интегральным мембранным белком, из одной формы (E1P) в другую (E2P) в течение ферментативного цикла [48]. Как следствие, наблюдается снижение показателей обобщенной жесткости и вязкости и повышение амплитуды деформации эритроцитов.

Действие этанола на клетки красной крови, измененные на фоне метаболического синдрома у пациентов с НАЖБП, но не готовые к воздействию алкоголя, приводит, очевидно, к ингибированию или снижению активности ферментных систем – отсюда изменение формы – переход в сфероциты с резким снижением амплитуды деформации.

Результаты экспериментов с воздействием этанола *in vitro* зачастую противоречивы или их сложно сопоставить. Это обусловлено различными обследуемыми группами, отличиями в условиях экспериментов, использованием разных критериев оценки воздействия, иных видов регистрирующих устройств. Так, данные литературы свидетельствуют о снижении микровязкости мембран эритроцитов здоровых доноров и нечувствительности таковых к этанолу у больных алкоголизмом при предварительной преинкубации с этанолом [49]. Однако, в этих исследованиях были использованы более высокие концентрации этанола (0,25% и 0,50%), более длительное время инкубации – 30 и 60 мин [49] или 6 и 22 часа [50], а также были исследованы эритроциты здоровых доноров и пациентов – больных алкоголизмом (две полярные группы).

В настоящем исследовании этанол оказывает действие в меньшей концентрации, более короткое время с одной стороны – на клетки красной крови

пациентов, регулярно потребляющих алкоголь, но не больных алкоголизмом, с другой – на эритроциты пациентов с метаболическим синдромом, проявления которого влияют на клетки красной крови, как показано ранее. Вероятно, преобладающим механизмом повреждающего действия неметаболизированного этанола на мембрану эритроцита в данном эксперименте является его влияние на липидный матрикс, приводящее к изменению физико-химического состояния мембраны, определяющего ее ионную проницаемость.

Данные Прокопьевой В. Д. и соавторов, 2003 [44] свидетельствуют о различной чувствительности $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналов к изменению объема эритроцитов у больных алкоголизмом и здоровых доноров. Можно предположить, что изначально существуют различия в организации мембранного каркаса эритроцитов у здоровых и больных алкоголизмом, которые приводят к неодинаковым структурным сдвигам мембранного каркаса в динамических условиях растяжения и сжатия клеток. Ранее также было показано, что этанол стимулирует активность кальциевой помпы эритроцитов доноров более, чем в 2,4 раза [51]. Увеличение Ca -индуцированной калиевой проницаемости мембраны эритроцитов является наиболее ранним событием в каскаде цитотоксических реакций, вызванных повышением внутриклеточной концентрации ионов кальция. Утечка ионов калия приводит к сжатию клеток, переходу их в предгемолитическое состояние и, наконец, к окончательному гемолизу. Таким образом, повышенная Ca^{2+} -зависимая калиевая проницаемость мембраны эритроцитов приводит к их дегидратации, снижению деформируемости и гемолизу [52–54]. Очевидно, подобный «сценарий» разворачивается у пациентов с НАЖБП. Следует заметить, что важнейший путь регуляции $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналов эритроцитов связан с цитоскелетом клеток [55], другой способ регуляции $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналов эритроцитов опосредован мембранными рецепторами, чувствительность которых у пациентов с хронической алкоголизацией существенно изменена, приводя к отсутствию существенной реакции со стороны $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналов или ее снижению, что, вероятно, происходит у пациентов с АЖБП.

В организме при хроническом поступлении высоких доз алкоголя эффекты этанола и его метаболитов, вероятно, суммируются. Кроме того, при действии этанола и его метаболитов *in vivo* происходят изменения практически во всех органах и системах, изменяется ионный состав крови, соотношение НАД/НАДН, развивается окислительный стресс, меняются реологические свойства крови, происходит нарушение эритропоэза и др. Все это оказывает дополнительное (по сравнению с влиянием этанола и его метаболитов *in vitro*) повреждающее действие на клеточные мембраны. Эритроциты «приспосабливаются» к функционированию в изменившихся условиях. Это обстоятельство, на наш взгляд, является основной причиной, по которой у больных хронически потребляющих этанол с АЖБП часто обнаруживаются структурно-функциональные нарушения клеток, не выявляемые (нарушение морфологии) или противоположные (снижение микровязкости

гидрофобной области липидов при действии этанола и ацетальдегида *in vitro* с одной стороны и повышение этого параметра у больных *in vivo* – с другой) при изучении эффектов этанола и его метаболитов в модельных экспериментах *in vitro*.

Таким образом, предложенный подход для различения жировой болезни печени алкогольного и неалкогольного генеза базируется на различном эффекте кратковременной экспозиции с физиологическими низкими дозами раствора этанола эритроцитов пациентов с АЖБП и НАЖБП. В качестве основного показателя предложена амплитуда деформации эритроцитов как наиболее метрологически корректный параметр. Различная динамика амплитуды деформации эритроцитов после экспозиции с этанолом: снижение у пациентов с НАЖБП и повышение – у больных с АЖБП – патогенетически обусловлена предшествующим хроническим

воздействием или отсутствием такового на клетки красной крови. Данный способ продемонстрировал высокие значения чувствительности (87,5%) и специфичности (96,2%), прогностической ценности положительного (95,4%) и отрицательного результата (89,3%), а также индекса точности (92%) для дифференциальной диагностики жировой болезни печени алкогольного и неалкогольного генеза.

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

Литература | References

1. Вельков В. В. Неинвазивные биомаркеры фиброза. До свиданья, биопсия? // Клинико-лабораторный консилиум. 2009. – Т. 30. – С. 34–44.
Vel'kov V. V. Neinvazivnyye biomarkery fibroza. Do svidan'ya, biopsiya? [Non-invasive biomarkers of fibrosis. Goodbye biopsy?] // Kliniko-laboratornyy konsilium [Clinical laboratory consultation] – 2009. – Vol. 30. – P. 34–44 (In Russ.).
2. Подымова С. Д. Болезни печени. – М.: Медицина, 1993. 544 с.
Podymova S. D. Bolezni pecheni [Liver diseases]. – M.: Meditsina, 1993. 544 p.
3. Ahn J. M., Paik Y.-H., Kim S. H., et al. Relationship of Liver Stiffness and Controlled Attenuation Parameter Measured by Transient Elastography with Diabetes Mellitus in Patients with Chronic Liver Disease // *Korean Med. Sci.* – 2014. – Vol. 29. – P. 1113–1111.
4. Тарасова О. И., Мазурчик Н. В., Огурцов П. П. Современные лабораторные маркеры употребления алкоголя // Клиническая фармакология и терапия. – 2007. – № 1. – С. 1–5.
Tarasova O. I., Mazurchik N. V., Ogurtsov P. P. Sovremennyye laboratornyye markery upotrebleniya alkogolya [Modern laboratory markers of alcohol use] // Klinicheskaya farmakologiya i terapiya [Clinical pharmacology and therapy]. – 2007. – № 1. – P. 1–5 (In Russ.).
5. Буеверов А. О., Маевская М. В., Ивашкин В. Т. Алкогольная болезнь печени // Болезни органов пищеварения. – 2001. – № . – С. 16–25.
Buyeverov A. O., Mayevskaya M. V., Ivashkin V. T. Alkogol'naya bolezny' pecheni [Alcoholic liver disease] // Bolezni organov pishchevareniya [Digestive diseases]. – 2001. – № . – P. 16–25 (In Russ.).
6. Хомерики С. Г., Хомерики Н. М. Алкогольная болезнь печени: механизмы развития, морфологические проявления, дифференциальная диагностика и патогенетические подходы к терапии // Consilium medicum. Гастроэнтерология. – 2012. – № 1. – С. 27–34.
Khomeriki S. G., Khomeriki N. M. Alkogol'naya bolezny' pecheni: mekhanizmy razvitiya, morfologicheskiye proyavleniya, differentsial'naya diagnostika i patogeneticheskiye podkhody k terapii // Consilium medicum. Gastroenterology. – 2012. – № 1. – P. 27–34 (In Russ.).
7. Ивашкин В. Т. Фиброз печени. Под ред. В. Т. Ивашкин, Ч. С. Павлов. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. 168 с.
Ivashkin V. T. Liver fibrosis / Pod red. V. T. Ivashkin, Ch. S. Pavlov. – M.: GEOTAR-Media, 2011. 168 p (In Russ.).
8. Ивашкин В. Т., Шульпекова Ю. О. Неалкогольный стеатогепатит // Бол. орг. пищевар. – 2000. – № 2. – С. 41–46.
Ivashkin V. T., Shul'pekova Yu. O. Nealkogol'nyy steatogepatit [Non-alcoholic steatohepatitis] // Bolezni organov pishchevareniya [Digestive diseases]. – 2000. – № 2 – P. 41–46.
9. Шерлок Ш., Дули Дж. Заболевания печени и желчных путей: практическое рук. Пер. с англ. под ред. З. Т. Апросиной, Н. А. Мухина. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2002. 859 с.
Sherlok S. H., Duli Dzh. Zabolevaniya pecheni i zhelchnykh putey: prakticheskoye ruk [Diseases of the liver and biliary tract: a practical guide]. Per. s angl. pod red. Z. T. Aprosinoy, N. A. Mukhina. – M.: GEOTAR-Media, 2002. 859 p.
10. Генералов В. М., Кручинина М. В., Дурманов А. Г. и др. Диэлектрофорез в диагностике инфекционных и неинфекционных заболеваний. – Новосибирск: Изд-во «ЦЭРИС», 2011. 172 с.
Generalov V. M., Kruchinina M. V., Durymanov A. G. et al. Dielektroforez v diagnostike infektsionnykh i neinfektsionnykh zabolevaniy [Dielectrophoresis in the diagnosis of infectious and non-infectious diseases]. – Novosibirsk: Izd-vo "TSERIS", 2011. – 172 p.
11. Кручинина М. В., Паруликова М. В., Курилович С. А. и др. 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. – Т. 9. – № . 145. – С. 106–115.
Kruchinina M. V., Parulikova M. V., Kurilovich S. A., Gromov A. A. et al. Change of erythrocyte, s parameters in patients with fat liver disease of alcohol and non-alcohol genesis in the dynamics of abstinent syndrome and decrease of body mass [Changes in the parameters of erythrocytes in patients with fatty liver disease of alcoholic and non-alcoholic genesis in the dynamics of abstinence syndrome and weight loss]. // Experimental

- and Clinical Gastroenterology Journal. – 2017. – Vol. 145. – No. 9. – P. 106–115.
12. Литвинова Е. С., Сорокин А. В., Долгарева С. А. и др. Белки и липиды мембраны эритроцитов при острой и хронической алкогольной интоксикации // Современные проблемы науки и образования. – 2017. – № 2. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=26351>.
 - Litvinova Ye. S., Sorokin A. V., Dolgareva S. A. i dr. Belkii lipidy membrany eritrotsitov pri ostroy i khronicheskoy alkogol'noy intoksikatsii [Erythrocyte membrane proteins and lipids in acute and chronic alcohol intoxication] // Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya [Modern problems of science and education]. – 2017. – № 2. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=26351>.
 13. Tyulina O. V., Prokorieva V. D., Dodd R. D., et al. *In vitro* effects of ethanol, acetaldehyde and fatty acid ethyl esters on human erythrocytes // Alcohol & Alcoholism. – 2002. – Vol. 37. – № 2. – P. 179–186.
 - Генералов В. М., Кручинина М. В., Громов А. А., Шувалов Г. В. Диэлектрофорез в биологии и медицине: Учеб.-метод. пособие – Новосибирск: Изд-во НГТУ, 2017. 179 с.
 - Generalov V. M., Kruchinina M. V., Gromov A. A., Shuvalov G. V. Dielektroforez v biologii i meditsine: Ucheb.-metod. Posobiye [Dielectrophoresis in Biology and Medicine: Teaching guide] – Novosibirsk: Izd-vo NGTU, 2017. 179 p.
 15. Oonishi T., Sakashita K. Ethanol improves decreased filterability of human red blood cells through modulation of intracellular signaling pathways // Alcohol Clin. Exp. Res. – 2000. – Vol. 24. – P. 352–356.
 - Рекомендации экспертов Всероссийского научного общества кардиологов по диагностике и лечению метаболического синдрома. Второй пересмотр // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2009. – № 6. – С. 1–29.
 - Rekomendatsii ekspertov Vserossiyskogo nauchnogo obshchestva kardiologov po diagnostike i lecheniyu metabolicheskogo sindroma. Vtoroy peresmotr [Recommendations of experts of the All-Russian Scientific Society of Cardiology for the diagnosis and treatment of metabolic syndrome. Second revision] // Cardiovascular Therapy and Prevention. – 2009. – № 6. – P. 1–29 (In Russ.).
 17. Гринхальх Т. Основы доказательной медицины. Перевод с англ. 4-е изд. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2018. 336 с.
 - Grinkhal'kh T. Osnovy dokazatel'noy meditsiny [Basics of Evidence-based medicine]. Pervod s angl. – 4-ye izd. – M.: GEOTAR-Media, 2018. 336 p.
 18. Сторожок С. А., Панченко Л. Ф., Филиппович Ю. Д., Глушков В. С. Изменения физико-химических свойств биологических мембран при развитии толерантности к этанолу // Вопросы медицинской химии. – 2001. – № 2. – С. 42–51.
 - Storozhok S. A., Panchenko L. F., Filippovich Yu, D, Glushkov V. S. Izmeneniya fiziko-khimicheskikh svoystv biologicheskikh membran pri razvitii tolerantnosti k etanolu [Changes in the physicochemical properties of biological membranes in the development of ethanol tolerance] // Voprosy meditsinskoj khimii [Questions in medical chemistry]. – 2001. – № 2. – P. 42–51.
 19. Maturu P., Reddy V. D., Padmavathi P., Varadacharyulu N. Ethanol induced adaptive changes in blood for the pathological and toxicological effects of chronic ethanol consumption in humans // Exp. Toxicol. Pathol. – 2012. – Vol. 64. – P. 697–703.
 - Tóth M. E., Vigh L., Sántha M. Alcohol stress, membranes and chaperones // Cell Stress Chaperones. – 2014. – Vol. 19. – P. 299–309.
 21. Maturu P., Vaddi D. R., Pannuru P., Nallanchakravarthula V. Modifications of erythrocyte membrane proteins, enzymes and transport mechanisms in chronic alcoholics: an *in vivo* and *in vitro* study // Alcohol Alcohol. – 2013. – Vol. 48. – P. 679–686.
 22. Tyulina O. V., Prokopieva V. D., Boldyrev A. A., Johnson P. Erythrocyte and plasma protein modification in alcoholism: A possible role of acetaldehyde // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease. – 2006. – Vol. 1762. – No. 5. – P. 558–563.
 23. Chu H., Breite A., Ciralo P., et al. Characterization of the deoxyhemoglobin binding site on human erythrocyte band 3: implications for O₂ regulation of erythrocyte properties // Blood. – 2008. – Vol. 111. – P. 932–938.
 24. Ярыгина Е. Г., Прокопьева В. Д. Изменение стабильности эритроцитов в присутствии различных концентраций этанола и ацетальдегида // Сибирский вестник психиатрии и наркологии. – 2005. – Т. 4. – № 38. – С. 14–16.
 - Yarygina Ye. G., Prokop'yeva V. D. Izmeneniye stabil'nosti eritrotsitov v prisutstvii razlichnykh kontsentratsiy etanola i atsetal'degida [Change in erythrocyte stability in the presence of various concentrations of ethanol and acetaldehyde] // Sibirskiy vestnik psikiatrii i narkologii [Siberian Bulletin of Psychiatry and Narcology]. – 2005. – Vol. 4. – № 38. – P. 14–16 (In Russ.).
 25. Dodson R. A., Hinds T. R., Vincenzi F. F. Effects of calcium and A23187 on deformability and volume of human red blood cells // Blood Cells. – 1987. – Vol. 12. – № 3. – P. 555–64.
 26. Ugur O., Onaran H. O. Allosteric equilibrium model explains steady-state coupling of beta-adrenergic receptors to adenylate cyclase in turkey erythrocyte membranes // Biochem. J. – 1997. – Vol. 323. – P. 765–76.
 27. Петрова И. В., Трубачева О. А., Гусакова С. В. Роль оксида азота в регуляции Ca²⁺-зависимой K⁺-проницаемости мембраны эритроцитов человека // Вестник ТГУ. – 2011. – Т. 378. – С. 165–8.
 - Petrova I. V., Trubacheva O. A., Gusakova S. V. Rol' oksida azota v regulyatsii Ca²⁺-zavisimoy K⁺-pronitsayemosti membrany eritrotsitov cheloveka [The role of nitric oxide in the regulation of Ca²⁺-dependent K⁺-permeability of human erythrocyte membrane] // Vestnik TGU [TSU Bulletin]. – 2011. – Vol. 378. – P. 165–8 (In Russ.).
 28. Vestergaard-Bogind B., Stampe P., Christophersen P. Voltage dependence of the Ca²⁺-activated K⁺-conductance of human red cell membranes is strongly dependent on the extracellular K⁺ concentration // J. Membr. Biol. – 1987. – Vol. 95. – No. 2. – P. 121–30.
 29. Haffner S. M., Gingerick R., Stern M. P., Bowsher R. R., Miettinen H. Principal proinsulin and specific insulin are associated with the source of diabetes among the Mexicans, not diabetes // J. Diabetes. – 1995. – Vol. 44. – № 10. – P. 1156–1160.
 30. Шилов А. М., Авшалумов А. Ш., Синицина Е. Н. и др. Изменения реологических свойств крови у больных с метаболическим синдромом // Русский Медицинский Журнал. – 2008. – Т. 16. – № 4(314). – С. 200–204.
 - Shilov A. M., Avshalumov A. Sh., Sinitsina Ye. N., et al. Izmeneniya reologicheskikh svoystv krovi u bol'nykh s metabolicheskim sindromom [Changes in the

- rheological properties of blood in patients with metabolic syndrome] // *Russkii Meditsinskiy Zhurnal* [Russian medical Journal]. – 2008. – Vol. 16. – № 4(314). – P. 200–204 (In Russ.).
31. **Новицкий В. В., Рязанцева Н. В., Степовая Е. А.** Физиология и патофизиология эритроцита. – Томск: Из-во ТГУ, 2004. 202 с.
Novitskiy V. V., Ryazantseva N. V., Stepovaya Ye. A. Fiziologiya i patofiziologiya eritrotsita [Physiology and pathophysiology of the erythrocyte]. – Tomsk: Iz-vo TSU, 2004. 202 p.
 32. **Леонова Т. Я.** К вопросу об эритроцитарном механизме регулирования холестеринемии при экспериментальной гиперхолестеринемии и ишемической болезни сердца. – Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Новосибирск, 1982. 22 с.
Leonova T. Ya. K voprosu ob eritrotsitarnom mekhanizme regulirovaniya kholesterinemii pri eksperimental'noy giperkholesterinemii i ishemicheskoy bolezni serdtsa [On the issue of erythrocyte cholesterol regulation mechanism in experimental hypercholesterolemia and coronary heart disease]. Kand. diss. Novosibirsk, 1982. 22 p.
 33. **Подымова С. Д.** Болезни печени: Руководство для врачей. Изд. 5-е, перераб. и доп. – М: ООО «Медицинское информационное агентство», 2018. 984 с.
Podymova S. D. Bolezni pecheni: Rukovodstvo dlya vrachey [Liver Diseases: A Guide for Doctors]. Izd. 5-ye, pererab. i dop. – M: OOO "Meditsinskoye informatsionnoye agentstvo", 2018. 984 p.
 34. **Авдеева Л. В., Алейникова Т. П., Адрианова Л. Е. и др.** Биохимия. Под ред. чл.-корр. РАН, проф. Е. С. Северина. – М: ГЭОТАР-Медиа, 2009. 519 с.
Avdeyeva L. V., Aleynikova T. P., Adrianova L. Ye. i dr. Biochemistry. Under red. chl.-korr. RAS, prof. E. S. Severina. – M: GEOTAR-Media, 2009. 519 p.
 35. **Буров Ю. В., Ведерникова Н. Н.** Нейрохимия и фармакология алкоголизма. – М.: Медицина, 1985. 237 с.
Burov Yu. V., Vedernikova N. N. Neyrokimiya i farmakologiya alkogolizma [Neurochemistry and Pharmacology of Alcoholism]. – M.: Meditsina, 1985. 237 p.
 36. **Гребеницкова О. Г., Алексеева А. Е., Потапкина Т. А., и др.** // Биохимия. – 1994. – Т. 59. – С. 509–515.
Grebenshchikova O. G., Alekseyeva A. Ye., Potapkina T. A., i dr. // Biochemistry. – 1994. – Vol. 59. – P. 509–515.
 37. **Киселев М. А., Киселев А. М., Борбелли Ш., Леви П.** Исследование проникновения этанола через модельную биологическую мембрану методом малоуглового рассеяния нейронов. // Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования. – 2006. – № 6. – С. 67–73.
Kiselev M. A., Kiselev A. M., Borbeli SH., Lezi P. Issledovaniye proniknoveniya etanola cherez model'nyuyu biologicheskuyu membranu metodom malougloвого rasseyaniya neyronov [The study of the penetration of ethanol through a model biological membrane by the method of small-angle scattering of neurons]. // Journal of Surface Investigation. X-Ray, Synchrotron and Neutron Techniques. – 2006. – № 6. – P. 67–73.
 38. **Brahm J.** Permeability of red cells to a series of alcohols // *The J. of General Physiology*. – 1983. – Vol. 81. – P. 283–304.
 39. **Maturu P., Vaddi D. R., Pannuru P., Nallanchakravarthula V.** Alterations in erythrocyte membrane fluidity and Na⁺/K⁺-ATPase activity in chronic alcoholics // *Mol. Cell Biochem.* – 2010. – Vol. 339. – P. 35–42.
 40. **Новицкий В. В., Рязанцева Н. В., Степовая Е. А.** Физиология и патофизиология эритроцита. – Томск: Изд-во Том. Ун-та, 2004. 202 с.
Novitskiy V. V., Ryazantseva N. V., Stepovaya E. A. Fiziologiya i patofiziologiya eritrotsita [Physiology and Pathophysiology of Erythrocyte]. – Tomsk: Izdatel'stvo TSU, 2004. – 202 p.
 41. **Gallagher P. G., Jarolim P.** Red blood cell membrane disorders. In: Hoffman R., Benz E. J. Jr., Shattil S. J., et al., editors. *Hematology: Basic Principles and Practice*. – Philadelphia, PA: Churchill Livingstone, 2009. P. 623–643.
 42. **Вуыюкюроглу М. Е., Альтикат С., Чифци М.** The effect of ethanol on glucose-6-phosphate dehydrogenase enzyme activity from human erythrocytes *in vitro* and rat erythrocytes *in vivo* // *Alcohol Alcoholism*. – 2002. – Vol. 37. – P. 327–329.
 43. **Терехина Н. А., Жидко Е. В., Терехин Г. А., Горячева О. Г.** Окислительная модификация белков и показатели антиоксидантной защиты при острой алкогольной интоксикации // *Медицинский алфавит*. – 2017. – Т. 4. – № 28. – С. 53–54.
Terekhina N. A., Zhidko Ye. V., Terekhin G. A., Goryacheva O. G. Okislitel'naya modifikatsiya belkov i pokazateli antioksidantnoy zashchity pri ostroy alkogol'noy intoksikatsii [Oxidative modification of proteins and antioxidant protection during acute alcohol intoxication]. // *Meditsinskiy alfavit* [Medical Alphabet]. – 2017. – Vol. 4. – № 28. – P. 53–54 (In Russ.).
 44. **Прокопьева В. Д.** Молекулярные механизмы влияния этанола и его метаболитов на клеточные мембраны *in vitro* и *in vivo*. Автореферат докт. диссертации. – Томск. – 2003.
Prokop'yeva V. D. Molekulyarnyye mekhanizmy vliyaniya etanola i yego metabolitov na kletochnyye membrany *in vitro* i *in vivo* [Molecular mechanisms of the effect of ethanol and its metabolites on cell membranes *in vitro* and *in vivo*]. Doct. diss. – Tomsk. – 2003.
 45. **Prokopieva V. D., Bohan N. A.** Modulation of the erythrocyte Na, K-ATPase from alcoholic patients by Mg²⁺-ions // *Alcohol Alcohol*. – 1999. – Vol. 34. – № 3. – P. 475–477.
 46. **Hamby-Mason R., Chen J. J., Schenker S., et al.** Henderson Catalase mediates acetaldehyde formation from ethanol in fetal and neonatal rat brain // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* – 1997. – Vol. 21. – P. 1063–1072.
 47. **Tephly T. R., Mannering G. J., Parks R. E.** Studies on the mechanism of inhibition of liver and erythrocyte catalase activity by 3-amino-1,2,4-triazole (AT) // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1961. – Vol. 133. – P. 77–82.
 48. **Болдырев А. А.** Na/K-АТФаза – свойства и биологическая роль // *Соросовский образовательный журнал*. – 1998. – № 4. – С. 1–9.
Boldyrev A. A. Na/K-ATfaza – svoystva i biologicheskaya rol' [Na / K-ATPase – properties and biological role] // *Sorosovskiy obrazovatelnyy zhurnal* [Soros Educational Journal]. – 1998. – № 4. – P. 1–9.
 49. **Бохан Н. А., Прокопьева В. Д.** Молекулярные механизмы влияния этанола и его метаболитов на эритроциты *in vivo* и *in vitro*. – Томск: Изд-во ТГУ, 2004. 166 с.
Bokhan N. A., Prokop'yeva V. D. Molekulyarnyye mekhanizmy vliyaniya etanola i yego metabolitov na eritrotsity *in vivo* i *in vitro* [Molecular mechanisms of the effect of ethanol and its metabolites on erythrocytes *in vivo* and *in vitro*]. – Tomsk: Izdatel'stvo TSU, 2004. 166 p.
 50. **Ярыгина Е. Г., Прокопьева В. Д.** Изменение стабильности эритроцитов в присутствии различных кон-

- центраций этанола и ацетальдегида // Сибирский вестник психиатрии и наркологии. – 2005. – Т. 4. – № 38. – С. 14–16.
- Yarygina E. G., Prokop'yeva V. D.* Izmeneniye stabil'nosti eritrotsitov v prisutstvii razlichnykh kontsentratsiy etanola i atsetal'degida [Change in erythrocyte stability in the presence of various concentrations of ethanol and acetaldehyde] // Sibirskiy vestnik psikhiiatrii i narkologii [Siberian Bulletin of Psychiatry and Narcology]. – 2005. – Vol. 4. – № 38. – P. 14–16 (In Russ.).
51. *Benaim G.* Ethanol stimulates the plasma membrane calcium pump from human erythrocytes // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. – 1994. – Vol. 1195. – No. 1. – P. 141–148.
52. *Birnbaumer L., Abramowitz J., Brown A. M.* Receptor-effector coupling by G- protein // *Biochim. et Biophys. Acta*. – 1990. – B. 1031. – No. 2. – P. 163–224.
53. *Burgess G. M., Claret M., Jenkinson D. M.* Effects of quinine and apamin on the calcium dependent potassium permeability of mammalian hepatocytes and red cells // *J. Physiol.* – 1981. – V. 317. – P. 67–90.
54. *Cabantchik Z. L., Knauf P. A., Rothstein A.* The anion transport system of red blood cell. The role of membrane protein evaluated by the use of "probes" // *Biochim. et Biophys. Acta*. – 1978. – Vol. 515. – P. 239–302.
55. *Петров И. В.* Функционирование и регуляция Ca²⁺-активируемых калиевых каналов эритроцитов. Доктор. диссер.д.б.н. – 1999. – Томск. 181 с.
- Petrov I. V.* Funktsionirovaniye i regulyatsiya Ca²⁺-aktiviruyemykh kaliyevykh kanalov eritrotsitov [Functioning and regulation of Ca²⁺-activated potassium channels of erythrocytes]. Doct. diss. – 1999. – Tomsk. 181 p.