

<https://doi.org/10.22416/1382-4376-2024-1215-3218>
УДК 616.36-003.826-07:612.111.6



Электрические и вязкоупругие параметры эритроцитов в составе диагностических моделей для дифференцирования жировой болезни печени смешанного генеза от неалкогольной и алкогольной жировой болезни печени

М.В. Кручинина^{1,2*}, М.Ф. Осипенко², М.В. Паруликова¹, А.А. Громов¹

¹ НИИ терапии и профилактической медицины — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Российская Федерация

² ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Российская Федерация

Цель исследования: создание диагностических моделей, включающих электрические, вязкоупругие параметры эритроцитов, для различения жировой болезни печени смешанной этиологии (метаболическая + алкогольная) от неалкогольной и алкогольной жировой болезни печени.

Материалы и методы. Обследованы 46 мужчин с неалкогольной жировой болезнью печени (НАЖБП), 43 мужчины с алкогольной жировой болезнью печени (АЖБП) и 54 мужчины с жировой болезнью печени (ЖБП) смешанного генеза (метаболический + алкогольный); средний возраст обследованных составил $48,4 \pm 9,6$ года. Диагноз был выставлен на основании данных ультразвукового исследования печени и индекса стеатоза печени FLI со степенью фиброза не более F1 (FibroScan® 502, Echosens, Франция). Электрические, вязкоупругие параметры эритроцитов исследованы методом диэлектрофореза с помощью электрооптической системы детекции клеток.

Результаты. Наиболее значимыми для дифференцирования ЖБП смешанного генеза (метаболический + алкогольный) от НАЖБП при использовании метода Volcano plot оказались поляризуемость клеток на частоте 10^6 Гц ($p = 6,49 \times 10^{-5}$), емкость клеточной мембраны эритроцитов ($p = 0,00077$) и относительная поляризуемость ($p = 0,001$), уровни которых были выше у пациентов с НАЖБП. Напротив, индекс деструкции эритроцитов на частоте 10^5 Гц оказался выше при смешанном генезе ЖБП ($p = 0,047$), а равновесная частота смещена в высокочастотный диапазон по сравнению с показателями при НАЖБП ($p = 0,0005$). Дискриминантный анализ дополнительно выявил значимость степени деформации эритроцитов на частоте 5×10^5 Гц в различении ЖБП смешанного генеза и НАЖБП. Диагностическая модель при дифференцировании ЖБП смешанного генеза от НАЖБП, включающая вышеописанные параметры эритроцитов, обеспечила AUC 0,829 (доверительный интервал (ДИ): 0,742–0,916), чувствительность — 80,9 %, специфичность — 83,3 %.

Установлены два показателя эритроцитов, статистически значимо отличающие жировую болезнь печени смешанного генеза от АЖБП (Volcano plot), — это индекс деструкции на частоте 5×10^5 Гц, который был выше при АЖБП ($p = 0,0007$), и емкость мембран клеток, величина которой преобладала при ЖБП смешанного генеза ($p = 0,011$). При различении ЖБП смешанного генеза от АЖБП комбинированная модель с включением трех параметров эритроцитов — индекса деструкции на частоте 5×10^5 Гц, емкости мембран эритроцитов и поляризуемости на частоте 10^6 Гц — показала наиболее высокие уровни диагностической точности: AUC = 0,751 (ДИ: 0,611–0,908) с чувствительностью 79,5 %, специфичностью 74,7 %.

Заключение. Электрические и вязкоупругие параметры эритроцитов, изученные с помощью метода диэлектрофореза, следует рассматривать как перспективные биомаркеры для диагностики диффузной патологии печени.

Ключевые слова: жировая болезнь печени, генез, диагностические модели, эритроциты, диэлектрофорез

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Работа выполнена по Государственному заданию в рамках бюджетных тем «Изучение молекулярно-генетических и молекулярно-биологических механизмов развития распространенных терапевтических заболеваний в Сибири для совершенствования подходов к их ранней диагностике и профилактике», 2024–2028 гг. (FWNR-2024-0004), «Совершенствование методов диагностики, профилактики и лечения больных распространенными заболеваниями гепатобилиарной системы и желудочно-кишечного тракта в Сибири», 2023–2025 гг. (FWNR-2023-0003).

Для цитирования: 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. <https://doi.org/10.22416/1382-4376-2024-1215-3218>

Electrical and Viscoelastic Parameters of Erythrocytes as a Part of Diagnostic Models for Differentiating Fatty Liver Disease of Mixed Genesis from Non-Alcoholic and Alcohol-Related Fatty Liver Disease

Margarita V. Kruchinina^{1,2*}, Marina F. Osipenko², Marina V. Parulikova¹, Andrei A. Gromov¹

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, Russian Federation

² Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

Aim: creation of diagnostic models including electrical, viscoelastic parameters of erythrocytes to distinguish fatty liver disease of mixed etiology (metabolic + alcoholic) from non-alcoholic and alcoholic fatty liver disease.

Materials and methods. We examined 46 men with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), 43 men with alcoholic fatty liver disease (AFLD), as well as 54 men with fatty liver disease (FLD) of mixed genesis (metabolic + alcohol-related); average age of the patients included in the study made 48.4 ± 9.6 years. The diagnosis was established on the basis of liver ultrasound findings and FLI liver steatosis index with a fibrosis grade of F1 or less (FibroScan® 502, Echosens, France). The electrical and viscoelastic parameters of erythrocytes were investigated by the diagnostic technique of dielectrophoresis using an electrooptical cell detection system.

Results. The most significant parameters for differentiating fatty liver disease of mixed genesis (metabolic + alcoholic) from NAFLD using the Volcano plot have turned out to be cell polarizability at a frequency of 10^6 Hz ($p = 6.49 \times 10^{-5}$), erythrocyte cell membrane capacity ($p = 0.00077$), relative polarizability ($p = 0.001$), the levels of which were higher in patients with NAFLD. On the contrary, the index of red blood cells destruction at 10^5 Hz was higher in FLD of the mixed genesis ($p = 0.047$) and the crossover frequency was shifted to the high frequency range more than in NAFLD ($p = 0.0005$). The discriminant analysis has additionally revealed the significance of the degree of erythrocyte deformation at 5×10^5 Hz in distinguishing between mixed-genesis FLD and NAFLD. In differentiating FLD of mixed genesis from NAFLD, a diagnostic model incorporating the above red blood cells parameters has provided an AUC of 0.829 (confidential interval: 0.742–0.916), sensitivity of 80.9 %, and specificity of 83.3 %.

Two indicators of red blood cells have been established that statistically significantly distinguish the mixed-genesis FLD from the AFLD (Volcano plot); these are the index of red blood cells destruction at a frequency of 5×10^5 Hz, which was higher with AFLD ($p = 0.0007$), and the capacity of cell membranes, the value of which prevailed in mixed-genesis FLD ($p = 0.011$). When distinguishing the mixed-genesis FLD from the AFLD, the combined model with the inclusion of three parameters of red blood cells, namely the index of red blood cells destruction at a frequency of 5×10^5 Hz, the capacity of erythrocyte membranes, and polarizability at a frequency of 10^6 Hz, has shown the highest levels of diagnostic accuracy, namely AUC = 0.751 (confidential interval: 0.611–0.908) with a sensitivity of 79.5 %, specificity of 74.7 %.

Conclusion. The electrical and viscoelastic parameters of erythrocytes studied using the diagnostic technique of dielectrophoresis should be considered as promising biomarkers for the diagnosis of diffuse liver disease.

Keywords: fatty liver disease, genesis, diagnostic models, erythrocytes, red blood cells, dielectrophoresis

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

The work was carried out according to the State assignment within the framework of the budget themes “Study of molecular genetic and molecular biological mechanisms of the development of common therapeutic diseases in Siberia to improve approaches to their early diagnosis and prevention”, 2024–2028 (FWNR-2024-0004), “Improving methods of diagnosis, prevention and treatment of patients with common diseases of the hepatobiliary system and gastrointestinal tract in Siberia”, 2023–2025 (FWNR-2023-0003).

For citation: Kruchinina M.V., Osipenko M.F., Parulikova M.V., Gromov A.A. Electrical and Viscoelastic Parameters of Erythrocytes as a Part of Diagnostic Models for Differentiating Fatty Liver Disease of Mixed Genesis from Non-Alcoholic and Alcohol-Related Fatty Liver Disease. Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology. 2024. <https://doi.org/10.22416/1382-4376-2024-1215-3218>

Введение

Неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) является наиболее распространенной причиной хронических заболеваний печени в мире, достигая 25–30 % [1]. С момента первого описания в 1980 г. НАЖБП рассматривалась как форма,

отличающаяся от связанной с потреблением алкоголя жировой болезни печени (ЖБП), несмотря на то что оба заболевания имеют общие патофизиологические механизмы, генетически-эпигенетические факторы и часто сосуществуют [2]. Оба заболевания характеризуются широким спектром гистологических характеристик: от изолированного

стеатоза до стеатогепатита и цирроза печени [3]. Различие между НАЖБП и алкогольной ЖБП в настоящее время основано на количестве потребляемого алкоголя, которое установлено условно [4, 5]. Учитывая синергетический эффект между потреблением алкоголя, ожирением и метаболической дисфункцией, вполне вероятно, что потребление алкоголя служит значимым фактором риска прогрессирования заболеваний печени при НАЖБП и метаболическом синдроме [6–8].

По мнению F. Idalgo et al., в клинической практике встречаются пациенты с алкогольной болезнью печени, имеющие метаболические кофакторы (алкогольная ЖБП с метаболическим синдромом), и пациенты с НАЖБП, употребляющие алкоголь, способствующий патологическому процессу (метаболически ассоциированная жировая болезнь печени с алкогольным компонентом). Эти категории пациентов тяготеют к противоположным полюсам, на которых находятся лица с неалкогольной болезнью печени без вклада алкоголя и алкогольной — без проявлений метаболического синдрома [9]. Установление преобладающего этиологического фактора у пациентов с ЖБП является непростой клинической задачей в связи со сходством гистологической картины при выполнении биопсии печени, изменений при использовании визуализирующих методов [3], пересекающимися метаболическими профилями [2], однонаправленными изменениями биомаркеров, входящих в состав диагностических панелей (алгоритмы «Ash-Fibro Test», «Nash-Fibro Test» в составе теста FibroMax, FM) [9, 10].

Предложенный в 2023 г. термин «steatotic liver disease» (стеатотическая, или стеатозная, болезнь печени) включает патологию с разными этиологическими факторами развития стеатоза (кардиометаболические факторы, алкоголь, вирусы гепатита, лекарства и др.), в том числе стеатотическую болезнь печени, ассоциированную с метаболической дисфункцией, метаболически ассоциированную алкогольную болезнь [11], что свидетельствует об актуальности данной проблемы.

Проведенные нами ранее исследования показали потенциал использования электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов, изученных методом диэлектрофореза, в установлении этиологии ЖБП [12–15].

Цель настоящего исследования — создание диагностических моделей, включающих электрические, вязкоупругие параметры эритроцитов, для различения жировой болезни печени смешанной этиологии (метаболическая + алкогольная) от неалкогольной и алкогольной жировой болезни печени.

Материалы и методы

Обследованы 46 мужчин (средний возраст — $48,6 \pm 8,7$ года) с НАЖБП, 43 мужчины с алкогольной ЖБП (средний возраст — $47,6 \pm 10,1$ года)

и 54 мужчины (средний возраст — $49,1 \pm 9,9$ года) с ЖБП смешанного генеза (метаболический + алкогольный).

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; степень фиброза печени не выше первой по данным непрямой эластометрии (FibroScan® 502, Echosens, Франция); 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; ЖБП печени на фоне вирусных, лекарственных, аутоиммунных, генетически детерминированных заболеваний печени, парентерального питания; ранние сроки абстиненции (менее 7–10 дней); степени фиброза печени, превышающие первую, по данным непрямой эластометрии; клинически значимая тяжелая сопутствующая патология в стадии обострения.

НАЖБП диагностирована в соответствии с критериями клинических рекомендаций [16]. Диагноз НАЖБП был подтвержден индексом NAFLD liver fat score [17]. Большая часть пациентов (73,9 %) не потребляли алкоголь вообще или эпизодически (3–4 раза в год) — низкие дозы алкоголя (в среднем $17,8 \pm 8,5$ г в сутки в пересчете на чистый этанол). Данные опросников и биохимические показатели позволили исключить алкогольную этиологию ЖБП.

Алкогольный генез стеатоза устанавливался по данным достоверно подтвержденного наличия систематического потребления алкоголя в настоящее время и в анамнезе (с помощью опросника CAGE и теста AUDIT) в сочетании с результатами клинко-инструментального обследования. Смешанная этиология (метаболическая + алкогольная) диагностировалась в случае регулярного потребления алкоголя пациентами с проявлениями метаболического синдрома согласно Рекомендациям экспертов Всероссийского научного общества кардиологов [18].

Исключена другая патология печени как причина стеатоза.

У больных с НАЖБП и ЖБП смешанного генеза выявлены признаки метаболического синдрома, которые были оценены по следующим критериям: основной критерий — центральный (абдоминальный) тип ожирения, окружность талии более 94 см; дополнительные критерии — артериальное давление $> 130/85$ мм рт. ст. или лечение артериальной гипертензии препаратами; повышение уровня триглицеридов ($\geq 1,7$ ммоль/л); снижение уровня холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП) $< 1,0$ ммоль/л; повышение содержания холестерина липопротеинов низкой плотности (ХС ЛПНП) $> 3,0$ ммоль/л; концентрация глюкозы плазмы натощак $\geq 6,1$

или 7,8 ммоль/л через 2 часа после нагрузки глюкозой. Достоверным метаболическим синдромом считали при наличии трех критериев: одного основного и двух дополнительных [18].

В качестве группы сравнения отобраны мужчины, проходившие профилактическое обследование, — 38 человек (средний возраст — $47,9 \pm 14,3$ года), ведущих здоровый образ жизни, употребляющих алкоголь не чаще 1 раза в месяц в дозах, не превышающих 20 г в сутки в пересчете на чистый этанол, без манифестирующей патологии внутренних органов и проявлений метаболического синдрома.

Всем обследованным выполнено исследование биохимических показателей, включая определение печеночных проб, параметров липидного профиля; определены индекс стеатоза печени (Fatty Liver Index, FLI) [16], индексы NAFLD liver fat score [19] и CARO [20]. Методом непрямого эластомерии на аппарате FibroScan® 502 (Echosens, Франция) определена степень выраженности фиброза печени (от F0 до F4 по шкале METAVIR). У пациентов основной группы с ЖБП она не превышала F1, в группе сравнения соответствовала F0.

У всех обследованных изучены электрические и вязкоупругие параметры эритроцитов методом диэлектрофореза в неоднородном переменном электрическом поле с помощью электрооптической системы детекции клеток [13]: средний диаметр эритроцита (мкм), доли дискоцитов, сфероцитов, деформированных клеток (%), поляризуемость клеток на разных частотах диапазона (м^3), относительная поляризуемость (соотношение величины показателя на 10^6 Гц к 10^5 Гц), обобщенные показатели жесткости (Н/м), вязкости ($\text{Па} \times \text{с}$), 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 (Ф), 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 оригинальных программ CELLFIND. Ошибка воспроизводимости метода составила 7–12 %.

Статистическая обработка данных выполнена с использованием IBM SPSS Statistics v. 26.0 (IBM Corp., США). В случае нормального распределения (метод Колмогорова — Смирнова) вычислялось среднее значение (М) и стандартное отклонение (SD). При сравнении двух нормально распределенных выборок использовался *t*-тест Стьюдента. При отсутствии нормального распределения вычислялись медиана (Me), 25-й и 75-й процентиля (Me (25 %; 75 %)). Достоверность различия показателей оценивали с помощью непараметрических критериев (*U*-критерий Манна — Уитни, Краскела — Уоллиса), использован критерий χ^2

Пирсона. Критический уровень значимости нулевой гипотезы (*p*) принимался равным 0,05. Связи между признаками оценивались вычислением коэффициента линейной корреляции Пирсона и Спирмена.

Выявление различий обеспечил ортогональный дискриминантный анализ методом наименьших квадратов (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA), использованы непарный (сравнение уровней параметров групп больных попарно) *t*-тест, метод Volcano plot и алгоритм машинного обучения Random Forest с применением программного обеспечения MATLAB (R2019a, Math Works) и языка программирования R [21]. Проводился ROC-анализ.

Результаты

Наличие стеатоза печени у всех обследованных пациентов подтверждено значениями индекса стеатоза печени FLI, превышающими 60 (с вероятностью более 78 %) [16], и величины NAFLD liver fat score более $-0,64$ (с чувствительностью 86 %, специфичностью 71 %) [17]. Все пациенты с НАЖБП и смешанным генезом ЖБП продемонстрировали наличие признаков метаболического синдрома: абдоминального ожирения, артериальной гипертензии, гипертриглицеридемии, гиперхолестеринемии; установлено статистически значимое повышение содержания инсулина, глюкозы крови натощак, мочевой кислоты. Величина индекса Саго менее 0,33 свидетельствовала о наличии инсулинорезистентности у всех пациентов с НАЖБП и смешанным генезом заболевания [20].

Пациенты с ЖБП алкогольного и смешанного генеза имели значение теста AUDIT ≥ 8 баллов и положительные ответы на 3–4 вопроса по опроснику CAGE. Большая часть обследованных с алкогольной ЖБП регулярно потребляла алкоголь (более 2–3 раз в неделю) в течение 8–22 лет, разовая доза потребляемого алкоголя составила $128,5 \pm 80,8$ г, недельная — $653,7 \pm 473,2$ г в пересчете на чистый этанол. 65,1 % пациентов указали на предпочтение крепких алкогольных напитков (водка, коньяк, виски), 30,2 % потребляли алкогольные напитки различной крепости, включая крепкий алкоголь. Пациенты со смешанным генезом ЖБП (метаболический + алкогольный) также систематически потребляли алкоголь с частотой ≥ 1 раза в неделю с предпочтением крепких алкогольных напитков приблизительно в 60 % случаев, однако с более низкими разовой и недельными дозами алкоголя ($108,2 \pm 65,3$ и $219,8 \pm 120,7$ г соответственно, в пересчете на чистый этанол).

Активность большей части печеночных ферментов (трансаминаз, гамма-глутаматтранспептидазы, щелочной фосфатазы), содержание общего билирубина, железа сыворотки крови, отражающих повреждение печени, у пациентов с ЖБП оказались выше, чем в группе сравнения, находясь в пределах референтных значений или с минимальными

отклонениями от них, что не исключает наличие стеатогепатита [22]. Активность аспартатамино-трансферазы, гамма-глутаматтранспептидазы, коэффициент де Ритиса, содержание прямого билирубина и железа сыворотки крови оказалось выше у пациентов с алкогольным генезом ЖБП по сравнению с другими группами, что косвенно подтверждает выраженность токсического воздействия высоких доз этанола на гепатоциты [23]. Содержание общего белка и альбумина у пациентов с ЖБП было сопоставимо со значениями у мужчин группы сравнения, что свидетельствует о сохранности белково-синтетической функции печени. Дислипидемия выявлена во всех группах пациентов с ЖБП; наиболее высокие уровни общего холестерина и триглицеридов оказались в группе со смешанным генезом заболевания; содержание ХС ЛПВП у пациентов с алкогольной ЖБП оказалось выше, чем при НАЖБП, что, вероятно, отражает систематическое потребление алкоголя [23]. Исследованная с помощью метода непрямой эластометрии жесткость печени имела тенденцию к увеличению в группе НАЖБП и у пациентов смешанным генезом ЖБП по сравнению с группой здоровых мужчин [24]. У пациентов с алкогольным генезом ЖБП плотность печени оказалась статистически значимо выше, чем в контроле ($p = 0,028$), подтверждая, что этанол — фактор фиброгенеза [23].

Пациенты с ЖБП отличались от группы сравнения меньшей долей дискоцитарных и большей — сфероцитарных, деформированных форм эритроцитов. Клетки красной крови пациентов с ЖБП по сравнению с группой контроля имели более низкие значения амплитуды деформации, емкости мембраны, скорости движения клеток к электродам, величины дипольного момента, поляризуемости на высоких частотах электрического поля 10^6 и $0,5 \times 10^6$ Гц, относительной поляризуемости и, напротив, более высокие уровни обобщенных показателей вязкости, жесткости, электропроводности, индексов агрегации и деструкции на всех частотах электрического поля, поляризуемости на низких частотах поля $0,1 \times 10^6$ и $0,05 \times 10^6$ Гц ($p < 0,000001$). У пациентов с ЖБП выявлено смещение равновесной частоты в высокочастотный диапазон (более $0,5 \times 10^6$ Гц). Наиболее выраженными отклонения в параметрах эритроцитов, по сравнению со здоровыми лицами, оказались у пациентов с ЖБП алкогольного и смешанного генеза [12–15].

При алкогольном генезе ЖБП статистически значимо выше оказался индекс деструкции эритроцитов на частоте 5×10^5 Гц ($p = 0,016$), равновесная частота более смещена в высокочастотный диапазон ($p = 2,13 \times 10^{-6}$). Напротив, емкость клеточной мембраны ($p = 1,21 \times 10^{-11}$), степень изменения амплитуды деформации эритроцитов на частоте 5×10^5 Гц ($p = 2,38 \times 10^{-8}$), поляризуемость клеток на частоте 10^6 Гц ($p = 9,38 \times 10^{-8}$), скорость

движения клеток к электродам ($p = 4,32 \times 10^{-6}$), величина дипольного момента ($p = 1,66 \times 10^{-5}$), относительная поляризуемость ($p = 2,35 \times 10^{-5}$) были ниже при АЖБП по сравнению с НАЖБП [15].

Была проведена нормализация электрических и вязкоупругих показателей эритроцитов по медиане (центрировано по среднему значению) для создания дифференциально диагностической модели в паре «ЖБП смешанной этиологии против НАЖБП» (рис. 1).

Для выявления различий в нормализованных уровнях параметров эритроцитов у пациентов с ЖБП смешанной этиологии и НАЖБП выполненный ортогональный дискриминантный анализ (OPLS-DA) показал наличие перечня показателей эритроцитов, по уровню которых группы статистически значимо различаются (рис. 2А).

Использование метода Volcano plot (непарная статистика) обеспечило установление электрических, вязкоупругих параметров эритроцитов, наиболее значимых для различения пациентов с неалкогольным и смешанным генезом ЖБП (табл. 1).

Наиболее значимыми для различения НАЖБП и ЖБП смешанной этиологии оказались поляризуемость клеток на частоте 10^6 Гц ($p = 6,49 \times 10^{-5}$), положение равновесной частоты ($p = 0,0005$), емкость клеточной мембраны ($p = 0,00077$), относительная поляризуемость ($p = 0,001$) и индекс деструкции эритроцитов на частоте 10^5 Гц ($p = 0,047$). При этом поляризуемость клеток на частоте 10^6 Гц, относительная поляризуемость и емкость клеточной мембраны оказались выше при НАЖБП по сравнению со смешанным генезом ЖБП. Напротив, при смешанном генезе ЖБП равновесная частота была сдвинута в высокочастотный диапазон, а на частоте 10^5 Гц гемолиз клеток более выражен, чем при НАЖБП.

На рисунке 3А представлено ранжирование изученных электрических, вязкоупругих параметров эритроцитов по вкладу в различение ЖБП неалкогольной и смешанной этиологии. Вклад в различение внесли такие характеристики, как доля деформированных клеток, электропроводность, индекс агрегации, которые были выше при смешанном генезе ЖБП, а также степень деформации эритроцитов на частоте 5×10^5 Гц и величина дипольного момента, которые, напротив, были выше при НАЖБП.

Исследованы ассоциации некоторых значимых для дифференциальной диагностики ЖБП параметров эритроцитов: емкости мембран и поляризуемости на частоте 10^6 Гц. Наиболее сильные прямые ($r \geq 0,5$) связи выявлены между величиной емкости мембран эритроцитов и величиной дипольного момента ($p = 0,002$), степенью деформации на частоте 5×10^5 Гц, амплитудой деформации на частоте 10^6 Гц ($p = 0,0001$), относительной поляризуемостью ($p = 0,006$), скоростью движения клеток к электродам ($p < 0,0001$), а обратная сильная связь — с положением равновесной частоты

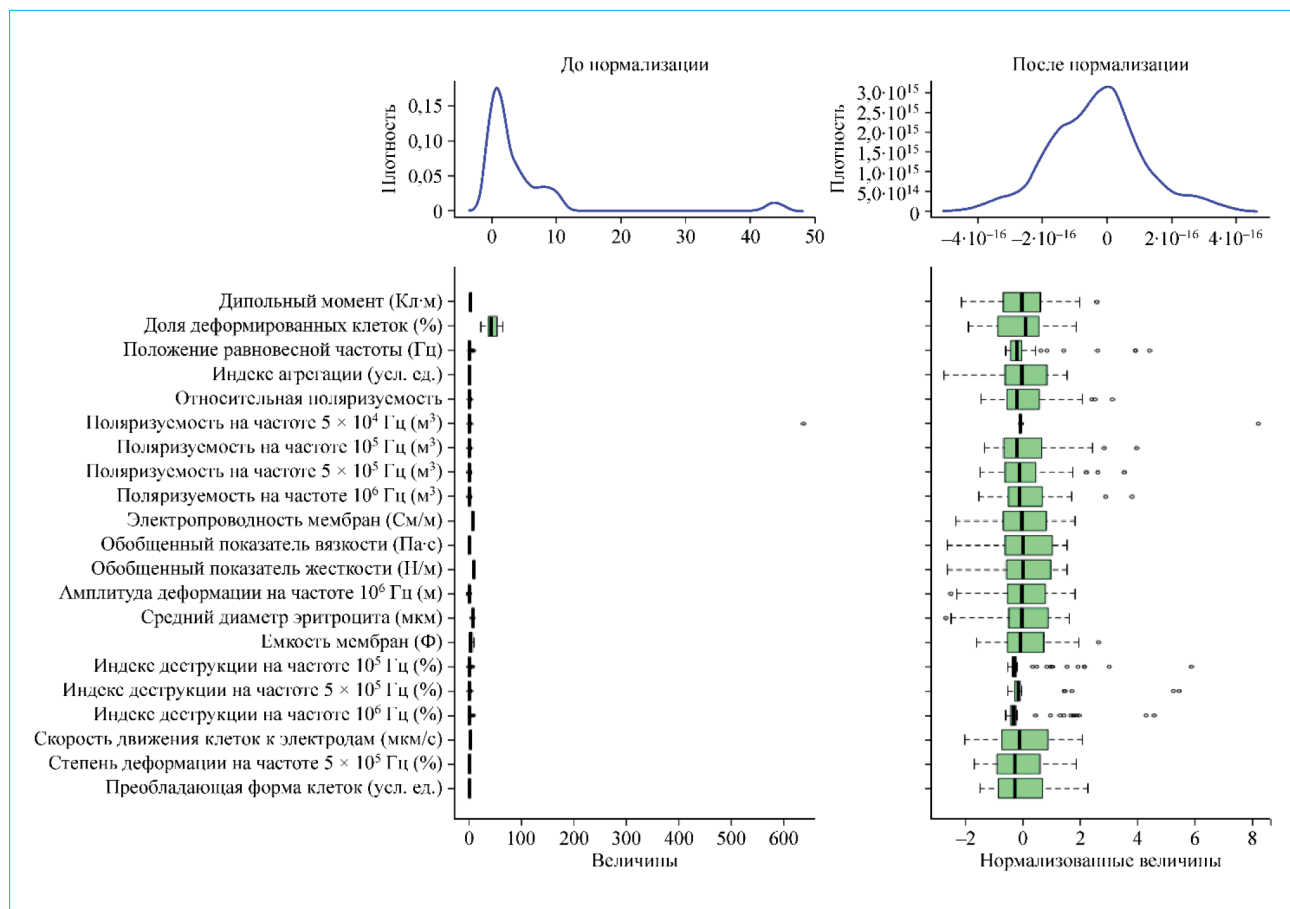


Рисунок 1. Нормализация величин электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов в группах пациентов с ЖБП неалкогольной и смешанной этиологии (слева — значения параметров до нормализации, справа — после нормализации)

Figure 1. Normalization of the values of electrical and viscoelastic parameters of erythrocytes in groups of patients with FLD of non-alcoholic and mixed etiology (on the left — parameter values before normalization, on the right — after normalization)

До нормализации — Before normalization; Обобщенный показатель жесткости ($\text{Н}\cdot\text{м}$) — Summarized rigidity index ($\text{N}\cdot\text{m}$); После нормализации — After normalization; Амплитуда деформации на частоте 10^6 Гц (м) — Deformation amplitude at frequency of 10^6 Hz (m); Дипольный момент ($\text{Кл}\cdot\text{м}$) — Dipole moment ($\text{Cl}\cdot\text{m}$); Средний диаметр эритроцита (мкм) — Average RBC diameter (μm); Доля деформированных клеток (%) — Proportion of deformed cells (%); Емкость мембран (Ф) — Membrane capacity (F); Плотность — Density; Положение равновесной частоты (Гц) — Crossover frequency position (Hz); Индекс разрушения на частоте ... Гц (%) — Index of RBC destruction at frequency of ... Hz (%); Индекс агрегации (усл. ед.) — Index of RBC aggregation (relative units); Скорость движения клеток к электродам ($\text{мкм}/\text{с}$) — Velocity of RBC motion to the electrodes ($\mu\text{m}/\text{s}$); Относительная поляризуемость — Relative polarizability; Степень деформации на частоте 5×10^5 Гц (%) — Deformation degree at 5×10^5 Hz (%); Поляризуемость на частоте ... Гц (м^3) — Polarizability at ... Hz (m^3); Преобладающая форма клеток (усл. ед.) — Predominant cell shape (relative units); Электропроводность мембран ($\text{См}/\text{м}$) — Electrical conductivity of membranes (Sm/m); Величины — Magnitudes; Обобщенный показатель вязкости ($\text{Па}\cdot\text{с}$) — Summarized viscosity index ($\text{Pa}\cdot\text{s}$); Нормализованные величины — Normalized magnitudes.

($p = 0,0015$). Поляризуемость на частоте 10^6 Гц прямо и достаточно сильно ассоциировала с поляризуемостью на частоте 5×10^5 Гц ($p = 0,007$), скоростью движения клеток к электродам ($p = 0,0038$), степенью деформации клеток на частоте 5×10^5 Гц ($p = 0,001$) и обратно — с индексом разрушения эритроцитов на частоте 10^5 Гц ($p = 0,004$).

Проведенный кластерный анализ (рис. 4) позволил выделить три основных кластера, в которые

входит большая часть пациентов изучаемых групп. Вероятно, в разные кластеры вошли пациенты с ЖБП с различной выраженностью некротических изменений в ткани печени.

Проведенный ROC-анализ для отдельных параметров эритроцитов для различения пациентов с НАЖБП от ЖБП смешанного генеза продемонстрировал достаточные уровни диагностической точности: для емкости мембран — $\text{AUC} = 0,759$,

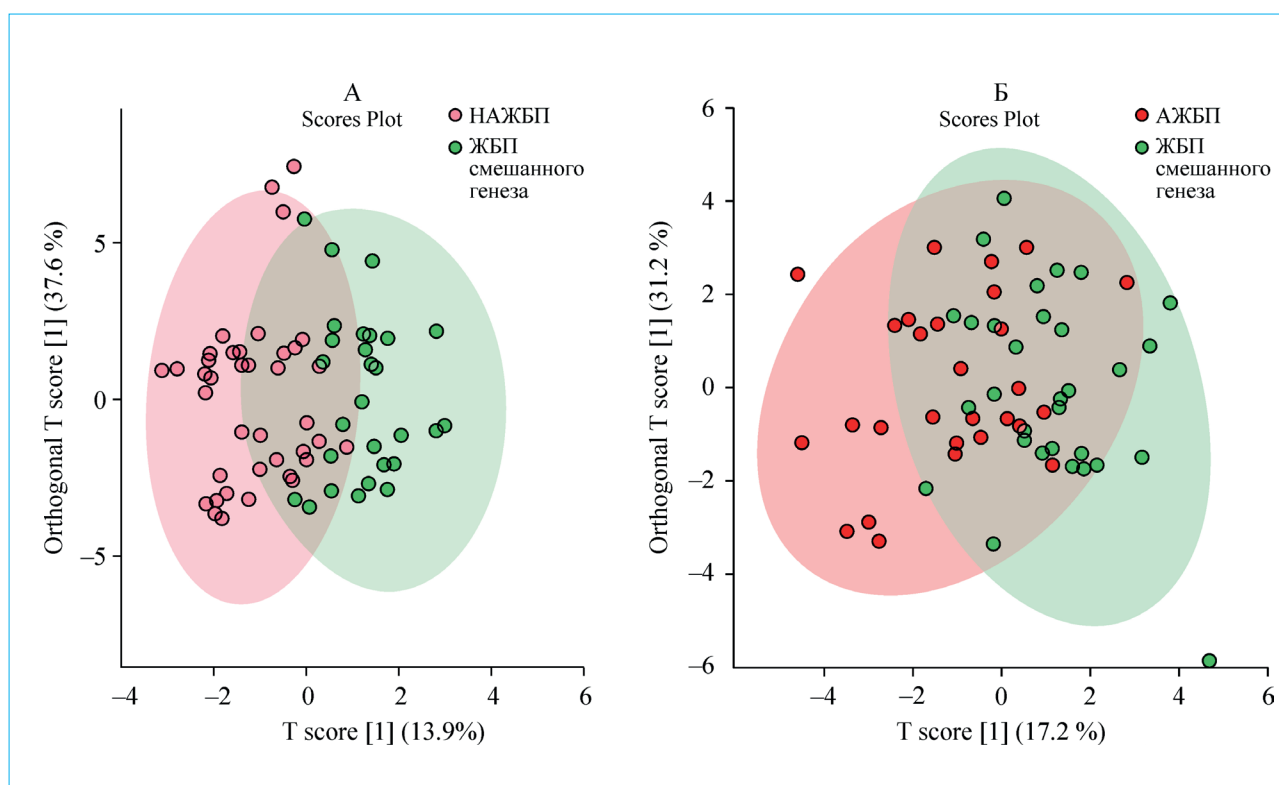


Рисунок 2. Дискриминантный анализ для различения уровней электрических, вязкоупругих параметров эритроцитов пациентов с ЖБП смешанной этиологии: А — от неалкогольного генеза ЖБП (розовое облако, розовые точки — уровни параметров эритроцитов в группе НАЖБП; зеленое облако, зеленые точки — в группе пациентов с ЖБП смешанного генеза); Б — от алкогольного генеза ЖБП (красное облако, красные точки — уровни параметров эритроцитов в группе алкогольной ЖБП; зеленое облако, зеленые точки — в группе пациентов с ЖБП смешанного генеза)

Figure 2. Discriminant analysis for distinguishing the levels of electrical, viscoelastic parameters of erythrocytes in patients with FLD of mixed etiology: A — from non-alcoholic origin of FLD (pink cloud, pink dots — levels of erythrocyte parameters in the NAFLD group; green cloud, green dots — in the group of patients with FLD mixed genesis); Б — from the alcoholic origin of FLD (red cloud, red dots — levels of erythrocyte parameters in the alcoholic FLD group; green cloud, green dots — in the group of patients with FLD of mixed genesis)

Таблица 1. Электрические и вязкоупругие параметры эритроцитов, исследованные методом Volcano plot (непарная статистика), у пациентов ЖБП различной этиологии (НАЖБП против ЖБП смешанной этиологии) — маркеры для дифференцирования

Table 1. Electrical and viscoelastic parameters of erythrocytes, studied by the Volcano plot method (unpaired statistics), in patients with FLD of various etiologies (NAFLD vs. FLD of mixed etiology) — markers for differentiation

Электрические и вязкоупругие параметры эритроцитов <i>Electrical and viscoelastic parameters of erythrocytes</i>	Кратность изменений <i>Factor of change (FC)</i>	$\log_2(FC)$	Значения p <i>p values (raw.p val)</i>	$-\log_{10}(p)$
Поляризуемость на частоте 10^6 Гц, m^3 <i>Polarizability at frequency 10^6 Hz, m^3</i>	1,6423	0,71569	6,49E-05	4,188
Положение равновесной частоты, Гц <i>Crossover frequency position, Hz</i>	0,30763	-1,7007	0,000509	3,2932
Емкость клеточной мембраны, Ф <i>Cell membrane capacity, F</i>	1,6034	0,68115	0,00077	3,1137
Относительная поляризуемость <i>Relative polarizability</i>	1,5037	0,58854	0,001094	2,9609
Индекс деструкции на частоте 10^5 Гц (%) <i>Destruction index at 10^5 Hz frequency (%)</i>	0,54131	-0,88547	0,047761	1,5092

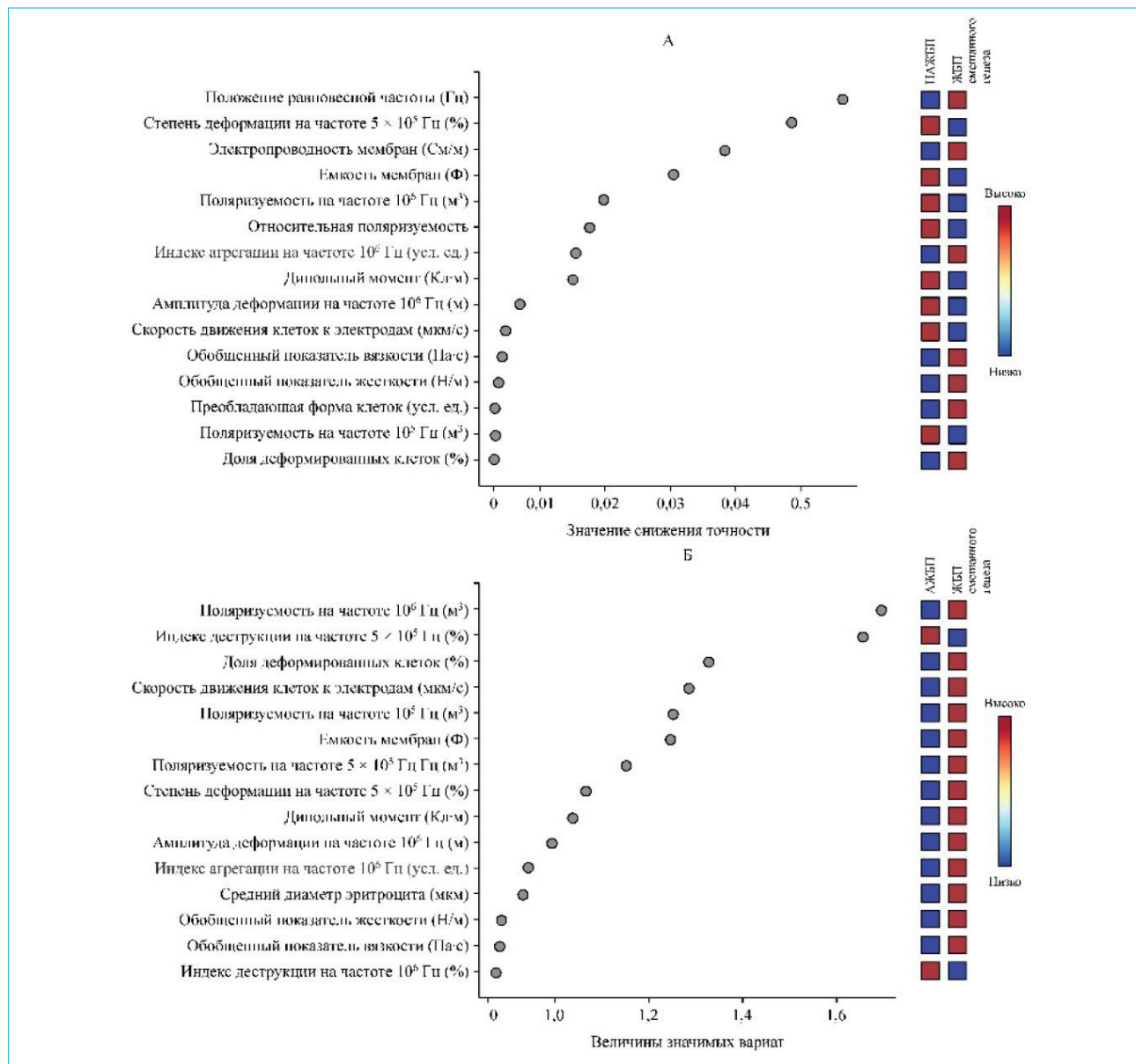


Рисунок 3. Ранжирование электрических, вязкоупругих параметров эритроцитов по вкладу в дифференцирование между ЖБП смешанного генеза: А — от неалкогольной ЖБП, Б — от алкогольной ЖБП

Figure 3. Ranking of electrical, viscoelastic parameters of erythrocytes according to their contribution to differentiation between FLD of mixed origin: А — from non-alcoholic FLD, Б — from alcoholic FLD

Положение равновесной частоты (Гц) — Crossover frequency position (Hz); Обобщенный показатель вязкости (Па·с) — Summarized viscosity index (Pa·s); Степень деформации на частоте 5×10^5 Гц (%) — Deformation degree at 5×10^5 Hz (%); Обобщенный показатель жесткости (Н·м) — Summarized rigidity index (N·m); Электропроводность мембран (См/м) — Electrical conductivity of membranes (Sm/m); Преобладающая форма клеток (усл. ед.) — Predominant cell shape (relative units); Емкость мембран (Ф) — Membrane capacity (F); Доля деформированных клеток (%) — Proportion of deformed cells (%); Поляризуемость на частоте ... Гц (м³) — Polarizability at ... Hz (m³); Индекс деструкции на частоте ... Гц (%) — Index of RBC destruction at frequency of ... Hz (%); Относительная поляризуемость — Relative polarizability; Средний диаметр эритроцита (мкм) — Average RBC diameter (μm); Индекс агрегации на частоте 10^6 Гц (усл. ед.) — Index of RBC aggregation at 10^6 Hz (relative units); Значение снижения точности — Value of accuracy reduction; Дипольный момент (Кл·м) — Dipole moment (Cl·m); Величины значимых вариантов — Values of significant variants; Амплитуда деформации на частоте 10^6 Гц (м) — Deformation amplitude at frequency of 10^6 Hz (m); Высоко/Низко — High/Low; ЖБП смешанного генеза — FLD of mixed genesis; Скорость движения клеток к электродам (мкм/с) — Velocity of RBC motion to the electrodes (μm/s); НАЖБП — NAFLD; АЖБП — AFLD.

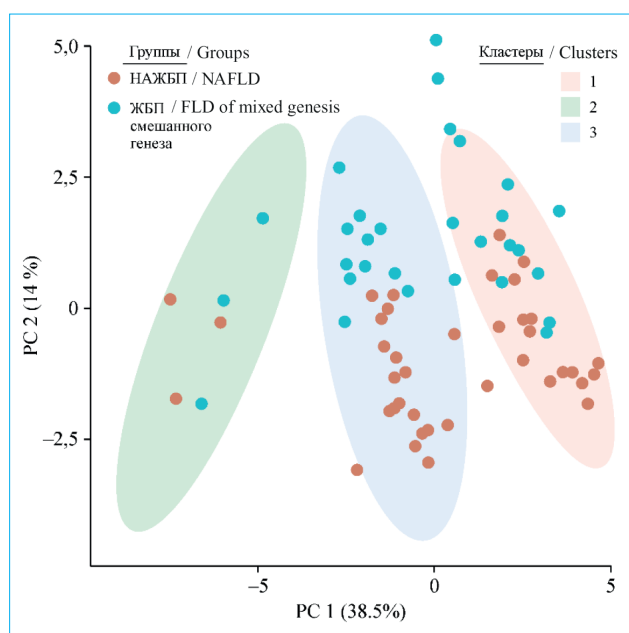


Рисунок 4. Кластерный анализ (K-means clustering) электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов у пациентов с НАЖБП и ЖБП смешанного генеза

Figure 4. Cluster analysis (K-means clustering) of electrical and viscoelastic parameters of erythrocytes in patients with NAFLD and FLD of mixed genesis

чувствительность 66,7 %, специфичность 79,5 %; для степени деформации клеток на частоте 5×10^5 Гц — AUC = 0,807, чувствительность 70 %, специфичность 84,6 %; для поляризуемости клеток на частоте 10^6 Гц — AUC = 0,784, чувствительность 80 %, специфичность 69,2 %; для положения равновесной частоты — AUC = 0,748, чувствительность 63,3 %, специфичность 87,2 %. Оптимальной по уровням чувствительности и специфичности с минимальным количеством показателей эритроцитов оказалась комбинированная модель, включающая такие параметры, как степень деформации эритроцитов на частоте 5×10^5 Гц, поляризуемость клеток на частоте 10^6 Гц и емкость мембран, обеспечивая AUC = 0,829 (ДИ: 0,742–0,916), чувствительность 80,9 %, специфичность 83,3 %.

Таблица 2. Электрические и вязкоупругие параметры эритроцитов, исследованные методом Volcano plot (непарная статистика), у пациентов ЖБП различной этиологии (алкогольная ЖБП против ЖБП смешанного генеза) — маркеры для дифференцирования

Table 2. Electrical and viscoelastic parameters of erythrocytes, studied by the Volcano plot method (unpaired statistics), in patients with FLD of various etiologies (alcoholic FLD versus FLD of mixed origin) — markers for differentiation

Электрические и вязкоупругие параметры эритроцитов <i>Electrical and viscoelastic parameters of erythrocytes</i>	Кратность изменений <i>Factor of change (FC)</i>	log2(FC)	Значения <i>p</i> <i>p values (raw.p val)</i>	–log10(<i>p</i>)
Индекс деструкции на частоте 5×10^5 Гц (%) <i>Destruction index at the frequency of 5×10^5 Hz (%)</i>	3,6763	1,8787	0,000715	3,1453
Емкость клеточной мембраны, Ф <i>Cell membrane capacity, F</i>	0,5565	–0,84775	0,011818	1,9274

При рассмотрении пары «ЖБП смешанной этиологии против алкогольной ЖБП» последовательно были проведены процедуры нормализации уровней параметров, после чего выполнены дискриминантный анализ (рис. 2Б), исследование методом Volcano plot (табл. 2), произведено ранжирование параметров эритроцитов по степени их вклада в различие ЖБП смешанного генеза от алкогольной ЖБП (рис. 3Б).

Из рисунка 2Б видно, что различающихся уровней параметров эритроцитов в данной паре «ЖБП смешанной этиологии против алкогольной ЖБП» меньше, чем в «ЖБП смешанной этиологии против НАЖБП», что подтвердили данные метода Volcano plot (табл. 2). Выявлено лишь два показателя эритроцитов, статистически значимо отличающих ЖБП смешанного генеза от алкогольной ЖБП, — это индекс деструкции на частоте 5×10^5 Гц, который был выше при алкогольной ЖБП ($p = 0,0007$), и емкость мембран клеток, которая оказалась выше при ЖБП смешанного генеза ($p = 0,011$).

Ранжирование вклада электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов в различие ЖБП смешанного генеза и алкогольной ЖБП продемонстрировало значимость поляризуемости на частоте 10^6 Гц, доли деформированных клеток, скорости движения к электродам, которые оказались выше у пациентов с ЖБП смешанного генеза по сравнению с показателями при алкогольной ЖБП (рис. 3Б).

Проведение ROC-анализа (рис. 5Б) показало более низкие уровни диагностической точности в различении алкогольной ЖБП и ЖБП смешанного генеза по сравнению с парой «НАЖБП против ЖБП смешанного генеза». Так, использование отдельных показателей эритроцитов в паре «алкогольная ЖБП против ЖБП смешанного генеза» обеспечивало либо достаточные уровни чувствительности при невысокой специфичности — для индекса деструкции на частоте 5×10^5 Гц (AUC = 0,718; чувствительность 86,7 %, специфичность 59,3 %), для доли деформированных клеток (AUC = 0,668; чувствительность 77,3 %, специфичность 59,3 %); либо достаточную специфичность при невысокой чувствительности — для поляризуемости на частоте 10^6 Гц (AUC = 0,705; чувствительность 63,3 %, специфичность 74,1 %),

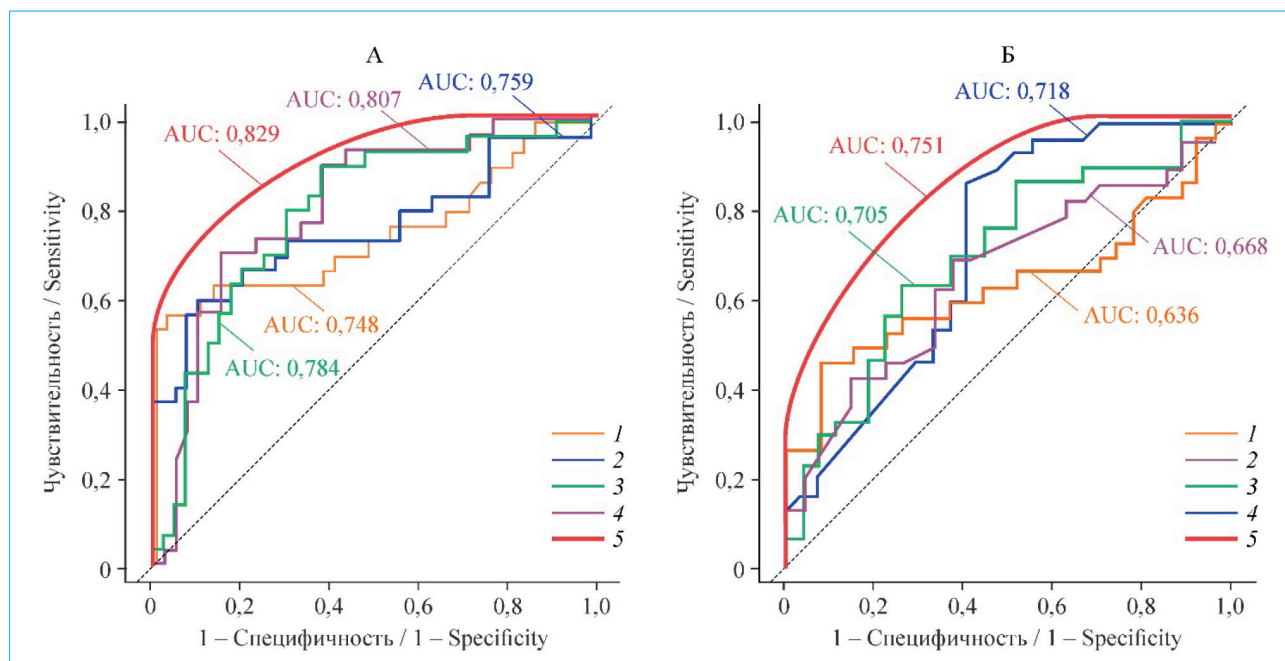


Рисунок 5. ROC-кривые для электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов в различении пациентов с ЖБП смешанного генеза: А — от НАЖБП (линии: 1 — положение равновесной частоты (Гц); 2 — емкость мембран (Ф); 3 — поляризуемость клеток на частоте 10^6 Гц (м^3); 4 — степень деформации эритроцитов на частоте 5×10^5 Гц (%); 5 — комбинированная модель, включающая три параметра: степень деформации эритроцитов на частоте 5×10^5 Гц, поляризуемость клеток на частоте 10^6 Гц и емкость мембран); Б — от АЖБП (линии: 1 — емкость мембран (Ф); 2 — доля деформированных клеток (%); 3 — поляризуемость клеток на частоте 10^6 Гц (м^3); 4 — индекс разрушения эритроцитов на частоте 5×10^5 Гц (%); 5 — комбинированная модель, включающая три параметра: индекс разрушения эритроцитов на частоте 5×10^5 Гц, поляризуемость клеток на частоте 10^6 Гц и емкость мембран)

Figure 5. ROC curves for electrical and viscoelastic parameters of erythrocytes in distinguishing patients with FLD of mixed origin: A — from NAFLD (lines: 1 — position of crossover frequency (Hz); 2 — membrane capacitance (F); 3 — polarizability of cells at a frequency of 10^6 Hz (m^3); 4 — degree of deformation of erythrocytes at a frequency of 5×10^5 Hz (%); 5 — combined model, including three parameters: the degree of deformation of erythrocytes at a frequency of 5×10^5 Hz, cell polarizability at a frequency of 10^6 Hz and membrane capacitance); Б — from AFLD (lines: 1 — membrane capacity (F); 2 — proportion of deformed cells (%); 3 — polarizability of cells at a frequency of 10^6 Hz (m^3); 4 — index of destruction of erythrocytes at a frequency of 5×10^5 Hz (%); 5 — combined model, including three parameters: erythrocyte destruction index at a frequency of 5×10^5 Hz, cell polarizability at a frequency of 10^6 Hz and membrane capacitance)

для емкости мембран (AUC = 0,636; чувствительность 58,1 %, специфичность 74,1 %).

Наиболее оптимальной с точки зрения чувствительности и специфичности при минимальном перечне показателей оказалась модель, состоящая из трех характеристик: индекса разрушения на частоте 5×10^5 Гц, емкости мембран и поляризуемости на частоте 10^6 Гц — AUC = 0,751 (ДИ: 0,611–0,908), чувствительность 79,5 %, специфичность 74,7 % (рис. 5Б).

Корреляционный анализ выявил ассоциации наиболее значимых для различения ЖБП смешанного генеза и алкогольной ЖБП параметров эритроцитов и показателей стиля потребления алкоголя.

Установлены корреляции параметров эритроцитов с некоторыми проявлениями метаболического синдрома. Приводим наиболее значимые величины. Емкость мембран эритроцитов обратно

коррелировала с окружностью талии ($r = -0,419$; $p = 0,02$); индекс разрушения на частоте 10^5 Гц прямо ассоциирован с ИМТ ($r = 0,417$; $p = 0,022$) и степенью ожирения ($r = 0,399$; $p = 0,029$). Индекс разрушения на частоте 5×10^5 Гц прямо коррелировал с уровнем мочевой кислоты ($r = 0,475$; $p = 0,0001$). Разрушение эритроцитов на низкой частоте 10^5 Гц оказалась ассоциированной также с мочевой кислотой ($r = 0,557$; $p = 0,0001$). Выявлены обратные ассоциации показателей поляризуемости с уровнем глюкозы натощак и с уровнем мочевой кислоты ($r = -0,591$; $p = 0,0001$ и $r = -0,514$; $p = 0,0001$ соответственно). Индекс разрушения на частоте 5×10^5 Гц был связан с поляризуемостью на частоте 10^6 Гц и относительной поляризуемостью ($r = -0,480$; $p = 0,003$ и $r = -0,518$; $p = 0,0001$ соответственно); индекс разрушения на частоте 10^5 Гц — с поляризуемостью на частоте 10^6 Гц ($r = -0,422$; $p = 0,023$).

Обсуждение

В проведенных нами ранее исследованиях показаны особенности параметров эритроцитов у пациентов с алкогольной и неалкогольной ЖБП [12–15], но оставалось неясным, чем отличаются НАЖБП и алкогольная ЖБП от ЖБП смешанного генеза по электрическим и вязкоупругим параметрам.

Использование метода диэлектрофореза для данной цели обусловлено возможностью одномоментного получения информации о более чем двадцати параметрах эритроцитов, отражающих состояние как мембран клеток, так и цитоплазмы в ранние сроки, до появления отклонений в традиционно используемой гемограмме [13].

Наиболее значимыми для дифференцирования ЖБП оказались электрические и вязкоупругие показатели эритроцитов, ассоциированные с их резистентностью, состоянием мембран, поверхностным зарядом и способностью к деформации. Для пары «ЖБП смешанного генеза и НАЖБП» существенными для различия оказались пять параметров. Поляризуемость на частоте 10^6 Гц, относительная поляризуемость, емкость мембран были выше при НАЖБП, а повышенный индекс деструкции на частоте 10^5 Гц и более выраженное смещение равновесной частоты в высокочастотный диапазон были ассоциированы с ЖБП смешанного генеза. Последующий анализ с учетом ранжирования влияния показателей эритроцитов на различие ЖБП смешанного генеза и НАЖБП выявил значимость степени деформации эритроцитов на частоте 5×10^5 Гц, которая затем была включена в состав диагностической модели. В паре «ЖБП смешанного генеза и алкогольная ЖБП» по данным метода Volcano plot значимыми для различия оказываются лишь два параметра: высокий индекс деструкции эритроцитов на частоте 5×10^5 Гц при алкогольной ЖБП и более высокая емкость мембран при ЖБП смешанного генеза. В последующем анализе выявлен вклад в различие в этой паре поляризуемости клеток на частоте 10^6 Гц.

Известны данные о повышенном гемолизе эритроцитов на фоне алкогольной интоксикации [25, 26], гипергликемии и гиперинсулинемии [27, 28], синдроме цитолиза при диффузных заболеваниях печени [29, 30], дислипидемии [31, 32], повышенном уровне мочевого кислоты [33]. Выявлено наличие ассоциаций между вышеописанными факторами и индексом деструкции эритроцитов. Следует заметить, что степень гемолиза на низкой частоте 10^5 Гц была одним из дифференцирующих маркеров ЖБП смешанного генеза и НАЖБП, что отражало хроническое токсическое воздействие этанола на клетки при сочетании метаболического и алкогольного генеза ЖБП, отсутствующего у пациентов с НАЖБП. Смещение равновесной частоты в высокочастотный диапазон также отражало результат длительного воздействия на клетки высоких доз этанола, что было показано нами ранее [12] и определило роль данного показателя в дифференцировании групп с НАЖБП и ЖБП

смешанного генеза. В паре «ЖБП смешанного генеза и алкогольная ЖБП» также значимым оказался индекс деструкции на высокой частоте электрического поля (5×10^5 Гц). В данном случае фактор алкоголя присутствует в обеих группах, но при алкогольной ЖБП установлены более высокие разовые и недельные дозы потребляемого этанола, чем при ЖБП смешанного генеза.

Дозозависимый эффект этанола на выраженность гемолиза показан в экспериментальных работах A. Bertola et al. [34], C. Zheng et al. [35], а также в проспективном исследовании S. Mueller et al. [36]. В большой когорте злоупотребляющих алкоголем ($n = 439$) макроскопические признаки гемолиза наблюдались в 10 % всех исследованных образцов [35]. По данным исследования L.M. Chi et al., этанол индуцирует образование мембранных пор диаметром примерно 13 А, которое может быть связано с нарушением структуры мембранных цитоскелетных белков эритроцитов [37], что впоследствии приводит к гемолитической анемии [25, 26, 38]. Свободный гем может вызывать разнообразные прооксидантные и провоспалительные эффекты [39], повышение сыровоточного уровня маркера гемолиза CD163 [35].

Индекс деструкции при исследовании методом диэлектрофореза тесно связан с поляризуемостью клеток, которая отражает их жизнеспособность, биологическую активность и тесно связана с электрическими параметрами клетки [40, 41], содержанием силовой кислоты в мембране, электрофоретической подвижностью клеток и индексами агрегации [42]. В экспериментах *in silico* показано, что клетки лиц, систематически потребляющих алкоголь, обладают большей хрупкостью в ответ на гемолитический агент фенилгидразин [35], что согласуется с нашими данными о сниженных уровнях поляризуемости на частоте 10^6 Гц и относительной поляризуемости. Данное обстоятельство определило роль поляризуемости на высоких частотах (10^6 Гц) и относительной поляризуемости как биомаркеров для различения ЖБП смешанного генеза от НАЖБП и алкогольной ЖБП.

Способность эритроцита к деформации обусловлена жидким характером клеточного содержимого, эластичностью эритроцитарной мембраны и относительным избытком поверхностной площади мембраны по отношению к внутриэритроцитарному объему и состоянием гемоглобина [43, 44]. У пациентов с метаболически ассоциированной алкогольной ЖБП изменения эритроцитов усугубляются эффектами длительного воздействия этанола и его метаболитов, что отражается в степени изменения амплитуды деформации на частоте 5×10^5 Гц, определяя значимость данного параметра в различении ЖБП смешанного генеза и НАЖБП [45–48]. Гипергликемия и потенциально повышенные уровни Hb_{A1c} увеличивают обобщенный показатель жесткости клетки и обратно

влияют на ее способность к деформации [49], влияя на обобщенный показатель вязкости клеток и ее деформируемость.

Изменения показателей емкости мембраны оказались более выраженными при смешанном генезе ЖБП, чем при НАЖБП. В то же время в паре «ЖБП смешанного генеза и алкогольная ЖБП» более низкие величины емкости мембран оказались у пациентов с алкогольной этиологией жировой болезни печени. Наличие двух этиологических факторов — метаболического и алкогольного — предполагало более выраженные изменения данного показателя: более низкие величины емкости мембран оказались у пациентов с алкогольной этиологией ЖБП. Однако при алкогольном генезе ЖБП дозы этанола, приводящие к структурным изменениям в мембранах клеток, были существенно выше, вероятно, с большей выраженностью сдвигов, подтверждаемых экспериментами С. Zheng et al. по дозозависимым эффектам этанола [35], выявленными изменениями в соотношении холестерина/фосфолипиды, фракций фосфолипидов, увеличением плотности белков полосы 3, 4.2, 4.9, актина и гликофоринов [50], изменениями профиля жирных кислот мембран эритроцитов [51], что в большей степени повлияло на показатель емкости мембран эритроцитов при алкогольной ЖБП.

Заключение

Таким образом, наиболее значимыми для дифференцирования ЖБП смешанного генеза (метаболический + алкогольный) от НАЖБП при использовании метода Volcano plot оказались поляризуемость клеток на частоте 10^6 Гц ($p = 6,49 \times 10^{-5}$), емкость клеточной мембраны

эритроцитов ($p = 0,00077$) и относительная поляризуемость ($p = 0,001$), уровни которых были выше у пациентов с НАЖБП. Индекс деструкции эритроцитов на частоте 10^5 Гц оказался выше при смешанном генезе ЖБП ($p = 0,047$), а равновесная частота смещена в высокочастотный диапазон по сравнению с показателями при НАЖБП ($p = 0,0005$). Дискриминантный анализ дополнительно выявил значимость степени деформации эритроцитов на частоте 5×10^5 Гц в различении ЖБП смешанного генеза и НАЖБП. При дифференцировании ЖБП смешанного генеза от НАЖБП диагностическая модель, включающая степень деформации эритроцитов на частоте 5×10^5 Гц, поляризуемость клеток на частоте 10^6 Гц и емкость мембран, обеспечила AUC = 0,829 (ДИ: 0,742–0,916), чувствительность 80,9 %, специфичность 83,3 %.

Установлены два показателя эритроцитов, статистически значимо отличающих ЖБП смешанного генеза от алкогольной ЖБП (Volcano plot) — это индекс деструкции на частоте 5×10^5 Гц, который был выше при алкогольной ЖБП ($p = 0,0007$), и емкость мембран клеток, величина которой преобладала при ЖБП смешанного генеза ($p = 0,011$). При различении ЖБП смешанного генеза от алкогольной ЖБП комбинированная модель с включением трех параметров эритроцитов — индекса деструкции на частоте 5×10^5 Гц, емкости мембран эритроцитов и поляризуемости на частоте 10^6 Гц — показала наиболее высокие уровни диагностической точности — AUC = 0,751 (ДИ: 0,611–0,908) с чувствительностью 79,5 %, специфичностью 74,7 %.

Электрические и вязкоупругие параметры эритроцитов, изученные с помощью метода диэлектрорефа, следует рассматривать как перспективные биомаркеры в дальнейших исследованиях для диагностики диффузной патологии печени.

Литература / References

1. Cotter T.G., Rinella M. Nonalcoholic fatty liver disease 2020: The state of the disease. *Gastroenterology*. 2020;158(7):1851–64. DOI: 10.1053/j.gastro.2020.01.052
2. Paik J.M., Golabi P., Biswas R., Alqahtani S., Venkatesan C., Younossi Z.M. Nonalcoholic fatty liver disease and alcoholic liver disease are major drivers of liver mortality in the United States. *Hepatol Commun*. 2020;4(6):890–903. DOI: 10.1002/hep4.1510
3. Craciun A., Lackner C., Cortez-Pinto H. Nonalcoholic fatty liver disease versus alcohol-related liver disease: Is it really so different? *Curr Pharm Des*. 2020;26(10):1093–109. DOI: 10.2174/1381612826666200122152417
4. European Association for the Study of the Liver (EASL); European Association for the Study of Diabetes (EASD); European Association for the Study of Obesity (EASO). EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2016;64(6):1388–402. DOI: 10.1016/j.jhep.2015.11.004
5. Eslam M., Sanyal A.J., George J.; International Consensus Panel. MAFLD: A consensus-driven proposed nomenclature for metabolic associated fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2020;158(7):1999–2014.e1. DOI: 10.1053/j.gastro.2019.11.312
6. Seitz H.K., Mueller S., Hellerbrand C., Liangpunsakul S. Effect of chronic alcohol consumption on the development and progression of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Hepatobiliary Surg Nutr*. 2015;4(3):147–51. DOI: 10.3978/j.issn.2304-3881.2014.12.01
7. Aberg F., Puukka P., Salomaa V., Männistö S., Lundqvist A., Valsta L., et al. Risks of light and moderate alcohol use in fatty liver disease: Follow-up of population cohorts. *Hepatology*. 2020;71(3):835–48. DOI: 10.1002/hep.30864
8. Yi S.W., Choi J.S., Yi J.J., Lee Y.H., Han K.J. Risk factors for hepatocellular carcinoma by age, sex, and liver disorder status: A prospective cohort study in Korea. *Cancer*. 2018;124(13):2748–57. DOI: 10.1002/cncr.31406
9. Idalgoaga F., Kulkarni A.V., Mousa O.Y., Arrese M., Arab J.P. Non-alcoholic fatty liver disease and alcohol-related liver disease: Two intertwined entities. *Front Med (Lausanne)*. 2020;7:448. DOI: 10.3389/fmed.2020.00448
10. Chen Z., Ma Y., Cai J., Sun M., Zeng L., Wu F. et al. Serum biomarkers for liver fibrosis. *Clin Chim Acta*. 2022;537:16–25. DOI: 10.1016/j.cca.2022.09.022
11. Райхельсон К.Л., Маевская М.В., Жаркова М.С., Грецишников В.Р., Оковитый С.В., Деева Т.А. и др. Жировая болезнь печени: новая номенклатура и ее адаптация в Российской Федерации. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2024;34(2):35–44. [Raikhelson K.L., Maevskaya M.V., Zharkova M.S., Grechishnikov V.R., Okovityy S.V., Deeva T.A. et al.

- Zharkova M.S., Grechishnikova V.R., Okovityi S.V., Deeva T.A., et al. Steatotic liver disease: New nomenclature and its localization in the Russian Federation. *Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology*. 2024;34(2):35–44. (In Russ.). DOI: 10.22416/1382-4376-2024-961
12. Кручинина М.В., Паруликова М.В., Курилович С.А., Громов А.А., Генералов В.М., Кручинин В.Н. и др. Возможности метода диэлектрофореза эритроцитов в дифференцировании жировой болезни печени алкогольного и неалкогольного генеза у мужчин. *Атеросклероз*. 2020;16(4):27–42. [Kruchinina M.V., Parulikova M.V., Kurilovich S.A., Gromov A.A., Generalov V.M., Kruchinin V.N., et al. Possibilities of the method of dielectrophoresis of erythrocytes in distinction of patients with fatty liver disease of alcoholic and non-alcoholic genesis. *Atherosclerosis*. 2020;16(4):27–42. (In Russ.). DOI: 10.15372/ATER20200404
 13. Генералов В.М., Кручинина М.В., Дурыманов А.Г., Медведев А.А., Сафатов А.С., Сергеев А.Н. и др. Диэлектрофорез в диагностике инфекционных и неинфекционных заболеваний. Новосибирск: ЦЭРИС, 2011. [Generalov V.M., Kruchinina M.V., Durymanov A.G., Medvedev A.A., Safatov A.S., Sergeev A.N., et al. Dielectrophoresis in the diagnosis of infectious and non-infectious diseases. Novosibirsk: CERIS Publ., 2011. (In Russ.).]
 14. Кручинина М.В., Паруликова М.В., Громов А.А., Генералов В.М., Генералов К.В., Кручинин В.Н. и др. Острое воздействие этанола на эритроциты *in vitro*: новый подход к дифференциальной диагностике жировой болезни печени. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2019;172(12):122–34. [Kruchinina M.V., Parulikova M.V., Gromov A.A., Generalov V.M., Generalov K.V., Kruchinin V.N., et al. Acute effects of ethanol on erythrocytes *in vitro*: a new approach to differential diagnosis of fatty liver disease. *Experimental and clinical gastroenterology*. 2019;172(12):122–34. (In Russ.). DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-172-12-122-134
 15. Кручинина М.В., Осипенко М.Ф., Паруликова М.В., Белковец А.В., Кручинина Э.В. Диагностические модели, включающие электрические, вязкоупругие параметры эритроцитов, для дифференцирования жировой болезни печени алкогольного и неалкогольного генеза. *РМЖ. Медицинское обозрение*. 2024;8(6): принято в печать. [Kruchinina M.V., Osipenko M.F., Parulikova M.V., Belkovets A.V., Kruchinina E.V. Diagnostic models, including electrical, viscoelastic parameters of erythrocytes, for differentiating fatty liver disease of alcoholic and non-alcoholic origin. *Russian Medical Inquiry*. 2024;8(6): in press. (In Russ.).]
 16. Ивашкин В.Т., Маевская М.В., Жаркова М.С., Котовская Ю.В., Ткачева О.Н., Трошина Е.А. и др. Клинические рекомендации Российского общества по изучению печени, Российской гастроэнтерологической ассоциации, Российской ассоциации эндокринологов, Российской ассоциации геронтологов и гериатров и Национального общества профилактической кардиологии по диагностике и лечению неалкогольной жировой болезни печени. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2022;32(4):104–40. [Ivashkin V.T., Maevskaya M.V., Zharkova M.S., Kotovskaya Yu.V., Tkacheva O.N., Troshina E.A., et al. Clinical practice guidelines of the Russian Scientific Liver Society, Russian Gastroenterological Association, Russian Association of Endocrinologists, Russian Association of Gerontologists and Geriatricians and National Society for Preventive Cardiology on diagnosis and treatment of non-alcoholic liver disease. *Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology*. 2022;32(4):104–40. (In Russ.). DOI: 10.22416/1382-4376-2022-32-4-104-140
 17. Khang A.R., Lee H.W., Yi D., Kang Y.H., Son S.M. The fatty liver index, a simple and useful predictor of metabolic syndrome: analysis of the Korea National Health and Nutrition Examination Survey 2010–2011. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2019;12:181–90. DOI: 10.2147/DMSO.S189544
 18. Рекомендации экспертов Всероссийского научного общества кардиологов по диагностике и лечению метаболического синдрома (2-й пересмотр). *Практическая медицина*. 2010;5(44):81–101. [Recommendations of experts of the All-Russian Scientific Society of Cardiologists on the diagnosis and treatment of metabolic syndrome (2nd revision). *Practical medicine*. 2010;5(44):81–101. (In Russ.).]
 19. Kotronen A., Peltonen M., Hakkarainen A., Sevas-tianova K., Bergholm R., Johansson L.M., et al. Prediction of non-alcoholic fatty liver disease and liver fat using metabolic and genetic factors. *Gastroenterology*. 2009;137(3):865–72. DOI: 10.1053/j.gastro.2009.06.005
 20. Shah A.G., Lydecker A., Murray K., Tetri B.N., Contos M.J., Sanyal A.J.; Nash Clinical Research Network. Comparison of noninvasive markers of fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2009;7(10):1104–12. DOI: 10.1016/j.cgh.2009.05.033
 21. Breiman L. Random forests. *Machine Learning*. 2001;45:5–32. DOI: 10.1023/A:1010933404324
 22. Uslusoy H.S., Nak S.G., Gülden M., Biyikli Z. Non-alcoholic steatohepatitis with normal aminotransferase values. *World J Gastroenterol*. 2009;15(15):1863–8. DOI: 10.3748/wjg.15.1863
 23. Burt A.D., Ferrell L.D., Hübscher S.G. MacSween's pathology of the liver, 8th Edition. Elsevier; 2024.
 24. Zhang X., Wong G.L., Wong V.W. Application of transient elastography in nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Mol Hepatol*. 2020;26(2):128–41. DOI: 10.3350/cmh.2019.0001n
 25. Osna N.A., Tikhonovich I., Ortega-Ribera M., Mueller S., Zheng C., Mueller J., et al. Alcohol-associated liver disease outcomes: Critical mechanisms of liver injury progression. *Biomolecules*. 2024;14(4):404. DOI: 10.3390/biom14040404
 26. Mueller S. Pathophysiology of alcoholic hepatitis: Emerging role of enhanced red blood cell turnover. In: Mueller S., Heilig M. (eds) *Alcohol and alcohol-related diseases*. Springer, Cham; 2023:1211–23. DOI: 10.1007/978-3-031-32483-3_64
 27. Wang Y., Yang P., Yan Z., Liu Z., Ma Q., Zhang Z., et al. The relationship between erythrocytes and diabetes mellitus. *J Diabetes Res*. 2021;2021:6656062. DOI: 10.1155/2021/6656062
 28. Kruchinina M.V., Gromov A.A., Generalov V.M., Kruchinin V.N. Possible differential diagnosis of the degrees of rheological disturbances in patients with type 2 diabetes mellitus by dielectrophoresis of erythrocytes. *J Pers Med*. 2020;10(3):60. DOI: 10.3390/jpm10030060
 29. Mueller S. Evidence for red blood cell-derived aspartate aminotransferase in heavy drinkers. In: Mueller S., Heilig M. (eds) *Alcohol and alcohol-related diseases*. Springer, Cham; 2023:785–93. DOI: 10.1007/978-3-031-32483-3_41
 30. Kruchinina M.V., Kurilovich S.A., Gromov A.A., Generalov V.M., Kruchinin V.N. Peculiarities of erythrocytic parameters in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Journal of Analytical Sciences, Methods and Instrumentation*. 2016;6(1):6–14. DOI: 10.4236/jasmi.2016.61002
 31. Dimeski G., Mollee P., Carter A. Increased lipid concentration is associated with increased hemolysis. *Clin Chem*. 2005;51(12):2425. DOI: 10.1373/clinchem.2005.058644
 32. Gils C., Hansen D.L., Nybo M., Frederiksen H. Elevated Hemolysis Index is associated with higher risk of cardiovascular diseases. *Clin Chem Lab Med*. 2023;61(8):1497–505. DOI: 10.1515/cclm-2023-0114
 33. Wang Y., Ming J., Guo Z., Zhang W., Li X., Zhou S., et al. Association of serum uric acid with anemia in U.S. adults: A cross-sectional study using secondary data. *BMC Cardiovasc Disord*. 2023;23(1):291. DOI: 10.1186/s12872-023-03291-y
 34. Bertola A., Mathews S., Ki S.H., Wang H., Gao B. Mouse model of chronic and binge ethanol feeding (the NIAAA model). *Nat Protoc*. 2013;8(3):627–37. DOI: 10.1038/nprot.2013.032

35. Mueller S., Chen C., Mueller J., Wang S. Novel Insights into Alcoholic Liver Disease: Iron Overload, Iron Sensing and Hemolysis. *J Transl Int Med.* 2022;10(2):92–124. DOI: 10.2478/jtim-2021-0056
36. Mueller S., Mueller J. Alcohol and mortality: First preliminary lessons from a prospective 15 year follow-up study In: Mueller S., Heilig M. (eds) *Alcohol and alcohol-related diseases*. Springer, Cham; 2023:81–102. DOI: 10.1007/978-3-031-32483-3_7
37. Chi L.M., Wu W.G. Mechanism of hemolysis of red blood cell mediated by ethanol. *Biochim Biophys Acta.* 1991;1062(1):46–50. DOI: 10.1016/0005-2736(91)90333-4
38. Bartel M., Hofmann V., Wang S., Mueller J., Sundermann T.R., Mueller S. Confounders of serum phosphatidylethanol: Role of red blood cell turnover and cirrhosis. *Hepat Med.* 2023;15:195–208. DOI: 10.2147/HMER.S420732
39. Immenschuh S., Baumgart-Vogt E., Mueller S. Heme oxygenase-1 and iron in liver inflammation: A complex alliance. *Curr Drug Targets.* 2010;11(12):1541–50. DOI: 10.2174/1389450111009011541
40. Sebastián J.L., Muñoz S., Sancho M., Martínez G., Kaler K.V. Polarizability of red blood cells with an anisotropic membrane. *Phys Rev E.* 2010;81(2):022901. DOI: 10.1103/PhysRevE.81.022901
41. Generalov K., Generalov V., Safatov A., Durymanov A., Buryak G., Kruchinina M., et al. Nonlinear polarizability of erythrocytes in non-uniform alternating electric field. *Open Journal of Biophysics.* 2014;4:97–103. DOI: 10.4236/ojbiophys.2014.43011
42. Jovtchev S., Djenev I., Stoeff S., Stoylov S. Role of electrical and mechanical properties of red blood cells for their aggregation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.* 2000;164(2–3):95–104. DOI: 10.1016/S0927-7757(99)00345-3
43. Ebrahimi S., Bagchi P. A computational study of red blood cell deformability effect on hemodynamic alteration in capillary vessel networks. *Sci Rep.* 2022;12(1):4304. DOI: 10.1038/s41598-022-08357-z
44. Chen W., Shao S., Cai H., Han J., Guo T., Fu Y., et al. Comparison of erythrocyte membrane lipid profiles between NAFLD patients with or without hyperlipidemia. *Int J Endocrinol.* 2020;2020:9501826. DOI: 10.1155/2020/9501826
45. Rabai M., Detterich J.A., Wenby R.B., Toth K., Meiselman H.J. Effects of ethanol on red blood cell rheological behavior. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2014;56(2):87–99. DOI: 10.3233/CH-2012-1632
46. Palmieri V.O., Cicco G., Minerva F., Portincasa P., Grattagliano I., Memeo V., et al. Red blood cells (RBC) deformability and aggregability: Alterations in alcoholism. *Adv Exp Med Biol.* 2006;578:125–31. DOI: 10.1007/0-387-29540-2_20
47. Liu L., Huang S., Xu X., Han J. Study of individual erythrocyte deformability susceptibility to INFeD and ethanol using a microfluidic chip. *Sci Rep.* 2016;6:22929. DOI: 10.1038/srep22929
48. Brun J.F., Varlet-Marie E., Myzia J., Raynaud de Mauverger E., Pretorius E. Metabolic influences modulating erythrocyte deformability and eryptosis. *Metabolites.* 2021;12(1):4. DOI: 10.3390/metabo12010004
49. Carquin M., D'Auria L., Pollet H., Bongarzone E.R., Tyteca D. Recent progress on lipid lateral heterogeneity in plasma membranes: From rafts to submicrometric domains. *Prog Lipid Res.* 2016;62:1–24. DOI: 10.1016/j.plipres.2015.12.004
50. Bulle S., Reddy V.D., Padmavathi P., Maturu P., Puvvada P.K., Nallanchakravarthula V. Association between alcohol-induced erythrocyte membrane alterations and hemolysis in chronic alcoholics. *J Clin Biochem Nutr.* 2017;60(1):63–9. DOI: 10.3164/jcbn.16-16
51. Кручинина М.В., Осипенко М.Ф., Паруликова М.В., Кручинина Э.В. Жирные кислоты мембран эритроцитов в дифференцировании пациентов с жировой болезнью печени алкогольного, неалкогольного и смешанного генеза. *Эффективная фармакотерапия.* 2023;19(43):28–41. [Kruchinina M.V., Osipenko M.F., Parulikova M.V., Kruchinina E.V. Fatty acids of erythrocyte membranes in differentiating patients with fatty liver disease of alcoholic, non-alcoholic and mixed origin. *Effective pharmacotherapy.* 2023;19(43):28–41. (In Russ.)]. DOI: 10.33978/2307-3586-2023-19-43-28-41

Сведения об авторах

Кручинина Маргарита Витальевна* — доктор медицинских наук, доцент; ведущий научный сотрудник, заведующая лабораторией гастроэнтерологии, НИИ терапии и профилактической медицины — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН»; профессор кафедры пропедевтики внутренних болезней, ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.
Контактная информация: kruchmargo@yandex.ru; 630089, г. Новосибирск, ул. Б. Богаткова, 175/1.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0077-3823>

Осипенко Марина Федоровна — доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой пропедевтики внутренних болезней, ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.
Контактная информация: ngma@bk.ru; 630091, г. Новосибирск, Красный просп., 52.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5156-2842>

Information about the authors

Margarita V. Kruchinina* — Dr. Sci. (Med.), Docent; Leading Researcher, Head of the Gastroenterology Laboratory, Research Institute of Internal and Preventive Medicine — Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; Professor of the Department of Propaedeutics of Internal Diseases, Novosibirsk State Medical University.
Contact information: kruchmargo@yandex.ru; 630089, Novosibirsk, B. Bogatkova str., 175/1.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0077-3823>

Marina F. Osipenko — Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of Propaedeutics of Internal Diseases, Novosibirsk State Medical University.
Contact information: ngma@bk.ru; 630091, Novosibirsk, Krasny ave., 52.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5156-2842>

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

Паруликова Марина Владимировна — врач-гастроэнтеролог, старший преподаватель Отдела образования, НИИ терапии и профилактической медицины — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН».

Контактная информация: m_parulikova@mail.ru;
630089, г. Новосибирск, ул. Б. Богаткова, 175/1.
ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-8305-4091>

Громов Андрей Александрович — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории клинических биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний, руководитель Центра профилактики тромбозов, НИИ терапии и профилактической медицины — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН».

Контактная информация: gromov.center@rambler.ru;
630089, г. Новосибирск, ул. Б. Богаткова, 175/1.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9254-4192>

Marina V. Parulikova — Gastroenterologist, Senior Lecturer at the Department of Education, Research Institute of Internal and Preventive Medicine — Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences.

Contact information: m_parulikova@mail.ru;
630089, Novosibirsk, B. Bogatkova str., 175/1.
ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-8305-4091>

Andrei A. Gromov — Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher at the Laboratory of Clinical Biochemical and Hormonal Studies of Therapeutic Diseases, Head of the Thrombosis Prevention Center, Research Institute of Internal and Preventive Medicine — Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences.

Contact information: gromov.center@rambler.ru;
630089, Novosibirsk, B. Bogatkova str., 175/1.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9254-4192>

Поступила: 29.03.2024 Принята: 23.05.2024 Опубликовано: 30.06.2024
Submitted: 29.03.2024 Accepted: 23.05.2024 Published: 30.06.2024