

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

АССОЦИАЦИИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПАРАМЕТРОВ ЭРИТРОЦИТОВ СО СТРУКТУРОЙ ИХ МЕМБРАН У МУЖЧИН Г. НОВОСИБИРСКА С АТЕРОГЕННЫМИ ДИСЛИПИДЕМИЯМИ И АЛКОГОЛЬНЫМ ПОРАЖЕНИЕМ ПЕЧЕНИ

М.В. Кручинина¹, М.В. Паруликова¹, С.А. Курилович¹, А.А. Громов¹, В.М. Генералов²,
В.А. Рихтер³, Д.В. Семенов³, С.В. Морозов⁴, А.С. Соколова⁴, Н.Ф. Салахутдинов⁴,
М.В. Шашков⁵, В.Н. Сидельников⁵, В.Н. Кручинин⁶

¹ НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН

630089, г. Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, 175/1

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

³ ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН
630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8

⁴ ФГБУН Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН
630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 9

⁵ ФГБУН Институт катализа им. Г.К. Борескова СО РАН
630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 5

⁶ ФГБУН Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова СО РАН
630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 13

Обследован 151 мужчина в возрасте от 35 до 60 лет с диффузной патологией печени – 97 больных с хроническим гепатитом, 33 – с циррозом печени, 21 – с жировой болезнью печени. Из них алкогольное поражение печени (АПП) установлено у 66 человек. Стадия болезни определена на основании клинического, биохимического и инструментального исследований,

Кручинина Маргарита Витальевна – д-р мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории гастроэнтерологии, e-mail: kruchmargo@yandex.ru

Паруликова Марина Владимировна – младший научный сотрудник лаборатории гастроэнтерологии, e-mail: m_parulikova@mail.ru

Курилович Светлана Арсентьевна – д-р мед. наук, проф., зав. лабораторией гастроэнтерологии, e-mail: kurilovich@yandex.ru

Громов Андрей Александрович – канд. мед. наук, старший научный сотрудник, руководитель группы исследования гемостаза лаборатории клинических биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний, e-mail: gromovcenter@rambler.ru

Генералов Владимир Михайлович – д-р техн. наук, ведущий научный сотрудник отдела биофизики и экологических исследований, e-mail: general@vector.nsc.ru

Рихтер Владимир Александрович – канд. биол. наук, зам. директора по науке, лаборатория биотехнологии, e-mail: richter@nioch.nsc.ru

Семенов Дмитрий Владимирович – канд. хим. наук, старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии, e-mail: semenov@nioch.nsc.ru

Морозов Сергей Владимирович – канд. хим. наук, зав. лабораторией экологических исследований и хроматографического анализа, e-mail: moroz@nioch.nsc.ru

Соколова Анастасия Сергеевна – канд. хим. наук, научный сотрудник лаборатории физиологически активных веществ, e-mail: asokolova@nioch.nsc.ru

Салахутдинов Нариман Фаридович – д-р хим. наук, зав. отделом, лаборатория физиологически активных веществ, e-mail: anvar@nioch.nsc.ru

Шашков Михаил Вадимович – канд. хим. наук, аналитическая лаборатория, e-mail: shashkov@catalysis.ru

Сидельников Владимир Николаевич – д-р хим. наук, проф., зав. аналитической лабораторией, e-mail: sidelnikov@catalysis.ru

Кручинин Владимир Николаевич – канд. хим. наук, научный сотрудник лаборатории эллипсомерии, e-mail: kruch@isp.nsc.ru

© Кручинина М.В., Паруликова М.В., Курилович С.А., Громов А.А., Генералов В.М., Рихтер В.А., Семенов Д.В., Морозов С.В., Соколова А.С., Салахутдинов Н.Ф., Шашков М.В., Сидельников В.Н., Кручинин В.Н., 2017

включая ультразвуковое. Кроме того, у 19 больных для верификации диагноза проведена биопсия печени. Методами диэлектрофореза, тонкослойной и газовой хроматографии, ГХ/МС системы у пациентов исследованы структурно-функциональные параметры эритроцитов. Экспериментально установлено: жесткость, вязкость, электрическая проводимость мембраны, индексы агрегации, деструкции эритроцитов увеличиваются, а амплитуда деформации, поляризуемость клеток уменьшаются при АПП. В мембранах эритроцитов при АПП по сравнению со здоровыми людьми увеличено относительное содержание холестериновой фракции, насыщенных жирных кислот при снижении уровня общих липидов и фосфолипидов, триглицеридов, эфиров холестерина и ненасыщенных жирных кислот. Соотношение холестерин/фосфолипиды возросло за счет снижения уровня общих фосфолипидов (за счет уменьшения содержания фракций фосфатидилхолина, фосфатидилсерина, фосфатидилэтаноламина и сфингомиелина при увеличении относительного содержания лизофракций фосфолипидов). У пациентов с жировой болезнью печени выявлены однонаправленные изменения спектра жирных кислот в мембранах эритроцитов и сыворотке крови (повышение уровня насыщенных при снижении ненасыщенных). Установлены ассоциации с проявлениями атерогенных дислипидемий. Получены корреляции между показателями амплитуды деформации эритроцитов, вязкости, жесткости, электропроводности мембран, поляризуемости, индекса деструкции и уровнями холестериновой фракции, лизофракций, полиненасыщенных жирных кислот в мембранах эритроцитов, что может использоваться как дополнительные характеристики в целях диагностики алкогольного поражения печени.

Ключевые слова: диэлектрофорез, структура мембран, фосфолипиды, жирные кислоты, эритроцит, алкогольное поражение печени, атерогенные дислипидемии.

В проблеме алкогольных поражений печени особая роль отводится изменениям на уровне клеточных мембран. Все плазматические мембраны, несмотря на некоторые структурно-функциональные особенности, имеют одинаковую схему строения. S.L. Schrieg [1] показал возможность использования структурно-функциональных характеристик мембраны эритроцита в качестве модели для изучения других мембран, не доступных прямому исследованию, в том числе гепатоцитов. Таким образом, эритроцитарная мембрана является своеобразным «зеркалом», отражающим состояние других клеточных мембран. С другой стороны, сдвиги в электрических и вязкоупругих параметрах эритроцитов усугубляют течение диффузных заболеваний печени, приводя к нарушениям микроциркуляции и тканевой гипоксии. Данные по взаимозависимости липидного, фосфолипидного состава мембран и электрических, вязкоупругих параметров эритроцитов при алкогольном поражении печени (АПП) являются весьма важными. Они углубляют знания о патогенетических механизмах развития АПП. Кроме того, полученные корреляции позволят по изменениям вязкоупругих характеристик эритроцитов косвенно судить об изменениях их структуры (для изучения которой в настоящее время используются достаточно трудоемкие и дорогостоящие методики).

Цель настоящей работы – изучить особенности вязкоупругих и электрических характеристик эритроцитов в сопоставлении со структурными изменениями мембран клеток (липидный, жирно-кислотный состав) при поражении печени алкогольного генеза.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Обследован 151 мужчина в возрасте от 35 до 60 лет с диффузной патологией печени – 97 больных с хроническим гепатитом, 33 – с циррозом печени, 21 – с жировой болезнью печени алкогольного и неалкогольного генеза (НАЖБП) (как проявление метаболического синдрома [2] без прошлого и настоящего анамнеза по употреблению алкоголя). Из них алкогольное поражение печени установлено у 66 человек. Алкогольный генез верифицирован при отрицательных результатах иммуноферментного анализа (ИФА) сывороточных маркеров вирусных гепатитов и достоверно подтвержден систематическим потреблением алкоголя. Среди обследованных преобладали мужчины с частым потреблением алкоголя (от одного до нескольких раз в неделю или ежедневным), средняя недельная доза алкоголя в пересчете на чистый этанол составила $466,4 \pm 65,3$, у пациентов с алкогольной жировой болезнью печени (АЖБП) она превышала 150 г. Длительность алкогольного стажа составила $14,3 \pm 5,4$ года. Стадия болезни определена на основании клинического, биохимического и инструментального исследований, включая ультрасонографическое. Кроме того, у 19 больных для верификации диагноза проведена биопсия печени.

В качестве группы сравнения рассматривались практически здоровые мужчины (33 человека) в возрасте от 34 до 58 лет, ведущие здоровый образ жизни и употребляющие алкоголь не чаще 1–2 раз в месяц в дозе, не превышающей

30 г в неделю в пересчете на чистый этанол, у которых при обследовании не выявлено признаков заболеваний печени и иной патологии внутренних органов.

Обследование выполнено с одобрения Комитета биомедицинской этики «НИИТПМ» (01.11.2016). Все обследуемые заполняли стандартные анкеты: 1) информированное согласие пациента на участие в обследовании; 2) стандартную анкету о потреблении алкоголя. У больных с верифицированными диагнозами, а также у мужчин группы сравнения исследованы структурно-функциональные параметры эритроцитов методами диэлектрофореза (патент на изобретение № 2296327 от 30.08.2004), тонкослойной и газовой хроматографии. У пациентов с жировой болезнью печени и 17 мужчин группы сравнения проведено параллельное исследование состава жирных кислот в сыворотке крови и мембранах эритроцитов ГХ/МС системы на основе трех квадрулей Agilent 7000В (США).

Для проведения исследований кровь объемом 2 мл забирали вокутайнерами в 3,7 % цитратный буфер в соотношении 9 : 1, через 1 ч кровь вносили в 0,3 М раствор сахарозы (рН 7,36) в соотношении 1 : 20. Сразу после разведения эритроцитов проводились измерения. В измерительной ячейке на клетки воздействовали неоднородным переменным электрическим полем (НПЭП) со следующими параметрами: напряженность электрического поля 10^5 В/м, градиент напряженности электрического поля 10^{11} В/м², частотный диапазон $5 \cdot 10^4$ – 10^6 Гц.

Изучение электрических и вязкоупругих характеристик эритроцитов проводили на четырех фиксированных частотах, где оценивали поляризуемость клеток, обобщенные показатели жесткости, вязкости, электропроводность мембран, индекс деструкции, индекс агрегации, амплитуду деформации эритроцитов. Для распознавания образа клеток и компьютерной обработки данных использовался пакет оригинальных программ CELLFIND. Ошибка воспроизводимости метода 7–12 % [3].

Определение фосфолипидов в эритроцитах проводили методом двумерной тонкослойной хроматографии по методу Э. Шталь (1965 г.). Определение пяти фракций фосфолипидов (ФЛ): фосфатидилэтаноламина (ФЭА), фосфатидилхолина (ФХ), сфингомиелина (СФМ), фосфатидилсерина (ФС), лизофосфатидилхолина (ЛФХ) осуществляли на пластинках Kissellgell «Merck» F₂₅₄ (Германия) в системе растворителей хлороформ : метанол : 28 % водный аммиак (50 : 35 : 5). При оценке результатов учитывалась величина относительной подвиж-

ности отдельных фракций фосфолипидов на пластине. Количественное определение отдельных фракций фосфолипидов проводили после сжигания органической части по содержанию неорганического фосфора (P_n). Для определения P_n использовали унифицированный метод (В.В. Меньшиков, 1987). Определение содержания холестерина мембран эритроцитов проводили методом Златкиса–Зака (1969). Липиды мембран, полученные трехкратным гемолизом эритроцитов дистиллированной водой, выделяли методом J. Folsh et al. (1957). Общее содержание липидов в мембранах эритроцитов определяли по методу W. Bloor в модификации J. Brandon (1969). Спектр нейтральных липидов оценивали методом тонкослойной хроматографии на пластинках «Sorbfil» (Россия) в системе гептан : диэтиловый эфир : этилацетат (80 : 20 : 1,5). Идентификацию фракций липидов проводили с помощью соответствующих стандартов («Sigma», США) [4].

Определение жирно-кислотного состава мембран эритроцитов проводилось методами газохроматографического и хромато-масс-спектрометрического анализа метиловых эфиров жирных кислот, получаемых омылением липидов с последующей этерификацией жирных кислот метилатом натрия в метиловом спирте (ГОСТ P51486-99).

Анализ жирных кислот проводился на хроматографе HP 6890 фирмы «Hewlett Packard» (США), снабженном кварцевой капиллярной колонкой HP-5 (30 м × 0,32 мм, толщина жидкой фазы 0,25 мкм) и пламенно-ионизационным детектором. В качестве газа-носителя использовался гелий. Температуру колонки изменяли по следующей программе: 2 мин при 50 °С, подъем температуры до 280 °С с линейной скоростью 5 °С/мин и 10 мин при 280 °С. Температура детектора камеры для отбора пробы 280 °С. Для обработки хроматограмм использовалась программа «Chemstation». Состав жирных кислот рассчитывали методом внутренней нормализации, содержание отдельных жирных кислот представляли в процентах от суммы всех жирных кислот. Хромато-масс-спектрометрический анализ проводили на газовом хроматографе HP 6890А, снабженном капиллярной колонкой HP-5МС и масс-селективным детектором HP 5972А фирмы «Hewlett Packard» (США). Использовалась кварцевая капиллярная колонка HP-5, описанная выше. Идентификацию метиловых эфиров жирных кислот проводили по временам удерживания заведомых образцов и сопоставлением экспериментальных масс-спектров с масс-спектрами из базы данных NIST CSD (275000

соединений) с помощью системы обработки данных «Chemstation».

Статистическая обработка данных выполнена с использованием программы SPSS, ver.17. Достоверность различия показателей оценивали по критериям Стьюдента и Пирсона в случае, когда распределение подчинялось нормальному закону; в случаях отклонения распределения от нормального закона использовались непараметрические критерии (U-критерий Манна-Уитни, Колмогорова-Смирнова). Связи между признаками оценивались путем вычисления коэффициента корреляции Спирмена (r). Во всех процедурах статистического анализа критический уровень значимости нулевой гипотезы (p) принимался равным 0,05. Для дифференцирования состава жирных кислот в сыворотке крови и мембранах эритроцитов между лицами группы сравнения и пациентами с жировой болезнью печени использован метод главных компонент.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проделанной работы установлено, что хроническая интоксикация этанолом приводит к деполяризации эритроцитов, при этом амплитудно-частотные характеристики поляризации клетки в НПЭП являются хорошим индикатором физико-химических свойств ее мембраны и цитоплазмы, а также отражают состояние ее биологической активности [3].

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

Исследование электрических и вязкоупругих характеристик эритроцитов методом диэлектрофореза позволило обнаружить, что наиболее жесткими [Н/м] ($18,1 \cdot 10^{-6} \pm 6,96 \cdot 10^{-6}$ против $4,2 \cdot 10^{-6} \pm 6,3 \cdot 10^{-7}$, $p < 0,05$), вязкими [Па·с] ($0,104 \pm 0,17$ против $0,32 \pm 0,05$, $p < 0,05$) и плохо деформируемыми [м] ($6,97 \cdot 10^{-7} \pm 1,016 \cdot 10^{-7}$ против $2,6 \cdot 10^{-6} \pm 1,1 \cdot 10^{-7}$, $p < 0,0001$) оказались эритроциты больных с патологией печени алкогольного генеза, достоверно отличаясь от величин в группе сравнения. Получены высокодостоверные сильные обратные корреляции жесткости эритроцитов и амплитуды деформации ($r = -0,78$, $p < 0,002$). Индекс агрегации эритроцитов в растворе диэлектрика был самым высоким при алкогольном генезе заболевания ($0,74 \pm 0,032$ против $0,50 \pm 0,02$ в группе контроля, $p < 0,0001$).

В основе развития синдрома внутрисосудистой клеточной агрегации при алкогольной болезни лежит снижение отрицательного заряда эритроцитов [5, 6]. В настоящей работе при исследовании электрических характеристик эритроцитов отражением сниженного заряда было изменение поляризуемости [м³] эритроцитов, которая у больных с АПП оказалась достоверно ниже таковой у лиц группы сравнения при частотах 10^6 Гц ($2,34 \cdot 10^{-16} \pm 5,86 \cdot 10^{-17}$ против $1,6 \cdot 10^{-15} \pm 7,21 \cdot 10^{-16}$, $p < 0,05$) и $5 \cdot 10^5$ Гц ($1,35 \cdot 10^{-15} \pm 4,82 \cdot 10^{-16}$ против $5,68 \cdot 10^{-15} \pm 8,8 \cdot 10^{-16}$, $p < 0,0001$), а электропроводность мембран эритроцитов [1/Ом·м] – выше ($7,67 \cdot 10^{-5} \pm 2,7 \cdot 10^{-5}$ против $2,91 \cdot 10^{-5} \pm 3,0 \cdot 10^{-6}$, $p < 0,02$). Сниженная поляризуемость, отражающая снижение физиологической активности эритроцитов, оказалась тесно связанной с индексом деструкции клеток (%) под действием НПЭП ($r = +0,54$, $p < 0,03$). Этот показатель был достоверно выше на всех частотах у больных с АПП по сравнению с группой контроля ($8,9 \pm 1,2$ против $1,5 \pm 0,3$ на частоте 10^6 Гц, $p < 0,0001$).

Данные литературы и результаты собственных исследований свидетельствуют о тесной взаимозависимости электрических, вязкоупругих характеристик эритроцитов от структуры мембран [3, 6, 7]. Известно, что основными компонентами мембран эритроцитов в норме являются фосфолипиды и свободный холестерин [6, 7]. В настоящей работе установлено, что в мембранах эритроцитов у больных с АПП достоверно увеличено относительное содержание холестериновой фракции и снижены уровни общих липидов, фракции общих фосфолипидов, триглицеридов и эфиров холестерина по сравнению с аналогичными показателями у лиц контрольной группы (табл. 1). Получены прямые корреляции уровня холестериновой фракции в мембранах эритроцитов с обобщенными показателями вязкости ($r = +0,64$, $p < 0,02$), жесткости ($r = +0,47$, $p < 0,05$), электропроводности ($r = +0,57$, $p < 0,03$) и обратные – с амплитудой деформации эритроцитов ($r = -0,72$, $p < 0,01$), поляризуемостью при частоте 10^6 Гц ($r = -0,53$, $p < 0,05$). Снижение содержания триглицеридов в мембранах эритроцитов у больных с АПП по сравнению с соответствующим показателем у здоровых обследуемых, возможно, связано с недостаточностью ферментных систем печени, в которой синтезируется большинство липидов [8, 9].

Увеличение относительного содержания холестериновой фракции в мембранах эритроцитов у больных с АПП происходило за счет снижения абсолютного содержания фракций общих фосфолипидов и триглицеридов (см. табл. 1).

Таблица 1

Содержание общих липидов (г/л) и их состав (%) в мембранах эритроцитов у больных с АПП и лиц группы сравнения, $\bar{X} \pm m$

Группа обследованных	Общие липиды	Фракция общих фосфолипидов	Холестериновая фракция	Фракция триглицеридов	Фракция эфиров холестерина
Группа сравнения	3,74±0,12	24,21±0,87	33,64±1,76	20,03±1,01	22,12±0,98
Больные с АПП	2,87±0,25	21,37±0,94	41,98±1,34	16,83±1,34	19,72±0,92
<i>p</i>	<0,002	<0,01	<0,05	<0,05	<0,05

Наряду с содержанием холестерина, для поддержания стабильного состояния мембран клеток важное значение имеет величина соотношения холестерин/фосфолипиды [10]. Возрастное изменение этого показателя, наблюдаемое у больных с АПП, приводит к повышению вязкости и нарушению проницаемости липидного бислоя, изменению активности мембранно-связанных ферментов [6, 11, 12]. Нами получены прямые достоверные корреляции величины показателя со значениями обобщенной вязкости эритроцитов ($r = 0,437, p < 0,02$), жесткости клеток ($r = 0,513, p < 0,033$), электропроводности мембран эритроцитов ($r = +0,411, p < 0,048$) и обратные – с амплитудой деформации эритроцитов под действием НПЭП ($r = -0,583, p < 0,05$).

Исследованиями показано, что в результате встраивания холестерина в мембрану эритроцитов увеличиваются их размеры, изменяется форма с резким снижением фильтрационной способности [12–14]. В клинике все это может привести к затруднению движения эритроцитов по микроциркуляторному руслу и нарушению процессов переноса кислорода, т.е. быть причиной возникновения ишемических состояний. При АПП изменения эритроцитов приводят к ухудшению микрореологических свойств крови, повреждая эндотелий сосудов эритроцитарными агрегатами [15, 16]. Вместе с тем известно, что накопление холестерина в биологической мембране может происходить при активации перекисного окисления липидов, поскольку холестерин способен ингибировать перекисидацию структурированных липидов за счет ограниче-

ния молекулярной подвижности жирно-кислотных остатков фосфолипидного бислоя, выступая, таким образом, в роли структурного антиоксиданта [6, 13].

Обнаруженное в настоящей работе снижение уровня общих фосфолипидов (г/л) в мембранах эритроцитов у пациентов с АПП вызвано уменьшением содержания легкоокисляемых фракций ФЛ (фосфатидилхолина, фосфатидилсерина, фосфатидилэтаноламина и сфингомиелина) (табл. 2). Возможно, одной из причин снижения содержания фракций фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина является усиление их распада в мембранах эритроцитов под действием фосфолипазы A_2 с отщеплением жирных кислот, в частности арахидоновой кислоты [6, 17]. Окислительная деструкция фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина, связанная с большей ненасыщенностью жирно-кислотного состава этих фракций, способствует уменьшению активности противорадикальной системы мембран и снижению активности ряда мембранно-ассоциированных ферментов [6, 17–19].

Увеличение относительного содержания лизофракций ФЛ (лизофосфатидилхолина, лизофосфатидилэтаноламина), вероятно, связано с усилением процессов перекисного окисления липидов при АПП [9, 15, 17]. Избыточное накопление лизофракций в мембранах эритроцитов при соматической патологии алкогольного генеза является одной из причин снижения АТФ-азной активности. Наряду с изменением активности мембранно-связанных ферментов, повышенное содержание лизофосфатидилхоли-

Таблица 2

Содержание фракций фосфолипидов в мембранах эритроцитов у больных с АПП и лиц группы сравнения, $\bar{X} \pm m$

Группа обследованных	Фракция фосфолипидов, %				
	Фосфатидилхолин	Фосфатидилсерин	Фосфатидилэтаноламин	Сфингомиелин	Лизофосфатидилхолин
Группа сравнения	22,11±1,23	12,15±0,71	19,42±1,28	10,23±0,48	6,97±0,87
Больные с АПП	18,13±1,41	10,18±0,68	14,37±1,82	9,07±0,52	9,72±0,65
<i>p</i>	<0,05	<0,05	<0,05	<0,058	<0,02

на вызывает деформацию клеток, в том числе эритроцитов [6, 20]. Цитолитический эффект лизофосфолипидов обусловлен сочетанием действия их как поверхностно-активных веществ и ионофоров, вызывающих структурные перестройки липидного компонента и белков в мембранах клеток [7]. Возможно, одной из причин повышения индекса деструкции при АПП является увеличение количества лизофракций фосфолипидов. Получены прямые корреляции индекса деструкции при 10^6 Гц и уровня лизофосфатидилхолина в мембранах эритроцитов ($r = +0,420$, $p < 0,05$). Возрастание содержания в мембранах клеток лизофракций фосфолипидов может быть связано либо с повышением гидролиза соответствующих фосфолипидов, либо со снижением активности лизофосфолипазы.

Физико-химические свойства мембранных фосфолипидов во многом определяет метаболизм жирных кислот [6, 7]. По данным настоящего исследования наблюдается перераспределение относительного содержания основных (пальмитиновая, стеариновая, олеиновая, линолевая, арахидоновая) жирных кислот: во фракциях фосфолипидов мембран эритроцитов у больных с АПП по сравнению с контролем достоверно увеличено относительное содержание насыщенных жирных кислот при снижении ненасыщенных (в большей степени полиненасыщенных жирных кислот – докозотетраеновой, докозгексаеновой) (табл. 3).

Особенно заметно снижение содержания арахидоновой кислоты у больных с АПП (в два раза по сравнению с контролем), вероятно, за счет повышенного потребления арахидоната печенью для синтеза простагландинов [21].

Кроме того, при АПП во фракциях фосфолипидов мембран эритроцитов достоверно повышено отношение суммы насыщенных к

сумме ненасыщенных и, особенно, к сумме полиненасыщенных жирных кислот по сравнению с соответствующими показателями у здоровых людей (табл. 4).

Как известно, этанол активизирует процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) в мембране [13, 18, 19, 22], вследствие чего наблюдается уменьшение *цис*-двойных связей в жирно-кислотных остатках фосфолипидов эритроцитарной мембраны [23]. В результате этого увеличивается число упорядоченных участков. Очевидно, свой вклад в степень упорядоченности мембран вносят изменения белковых компонентов [7]. В связи с этим альтернативная гипотеза утверждает, что этанол влияет на встроенные в липиды белки, а изменения липидов носят вторичный характер [10, 18].

Снижение уровня полиненасыщенных жирных кислот при гепатитах прямо коррелировало с величинами обобщенных показателей вязкости ($r = 0,437$, $p < 0,02$), жесткости ($r = 0,513$, $p < 0,033$), электропроводности ($r = 0,411$, $p < 0,048$) мембран и обратно – с амплитудой деформации клеток под действием НПЭП ($r = -0,383$, $p < 0,05$).

У пациентов с жировой болезнью печени различного генеза проведено пилотное параллельное исследование жирно-кислотного состава мембран эритроцитов и сыворотки, методом главных компонент выявлено соотношение дифференцирующих жирных кислот между пациентами с жировой болезнью печени и мужчинами группы сравнения (рис. 1, 2). В мембранах эритроцитов здоровых обследуемых установлено более высокое содержание с-С18:1, С18:2, С18:3. С20:4, оно и дает дифференциацию от пациентов с ЖБП при статистической обработке ($p < 0,001$).

Таблица 3

Содержание жирных кислот во фракциях фосфолипидов мембран эритроцитов у больных с АПП и лиц группы сравнения, $X \pm m$

Группа обследованных	Содержание жирных кислот, %				
	Миристиновая	Пальмитиновая	Стеариновая	Пальмитоолеиновая	Олеиновая
Группа сравнения	0,020±0,013	14,75±1,42	12,32±1,58	1,42±0,36	15,24±1,28
Больные с АПП	0,11±0,041	18,71±1,38	18,10±1,97	0,57±0,22	10,56±1,32
<i>p</i>	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,02
Группы обследованных	Линолевая	Арахидоновая	Докозотетраеновая	Докозопентаеновая	Докозгексаеновая
Группа сравнения	16,13±1,64	13,67±2,87	3,67±0,54	3,28±0,87	6,02±1,34
Больные с АПП	7,07±2,52	6,12±2,91	1,78±0,61	1,44±0,35	1,79±1,13
<i>p</i>	<0,01	<0,05	<0,02	<0,05	<0,02

Показатели жирно-кислотного спектра фракций фосфолипидов мембран эритроцитов у больных с АПП и лиц группы сравнения, $\bar{X} \pm m$

Группа обследованных	Содержание арахидоновая кислота / линолевая кислота, $C_{20:4}/C_{18:2}$	Суммарное содержание насыщенных жирных кислот, %	Суммарное содержание ненасыщенных жирных кислот, %
Группа сравнения	0,84±0,17	63,15±1,71	36,85±2,17
Больные с АПП	0,87±0,14	72,18±2,68	27,82±2,95
<i>p</i>	<0,1	<0,01	<0,02
Группа обследованных	Суммарное содержание полиненасыщенных жирных кислот, %	Суммарное содержание насыщенных жирных кислот / суммарное содержание ненасыщенных жирных кислот	Суммарное содержание насыщенных жирных кислот / суммарное содержание полиненасыщенных жирных кислот
Группа сравнения	13,93±2,21	1,87±0,29	4,67±0,45
Больные с АПП	7,94±1,82	2,83±0,27	9,94±1,43
<i>p</i>	<0,05	<0,02	<0,001

В сыворотке крови здоровых обследуемых в отличие от пациентов с жировой болезнью печени выявлено более высокое содержание всех жирных кислот, особенно ненасыщенных — С16:2, С18:1, С18:2, С20:3, что и дает дифференцирование в обследуемых группах ($p < 0,001$).

По результатам компонентного анализа следует, что совершенно разные классы жирных кислот в случае эритроцитов и сыворотки «отвечают» за дифференцирование в группы. В случае мембран эритроцитов — это по большей части насыщенные и в меньшей степени омега-3 жирные кислоты, в сыворотке — в основном ненасыщенные самых разных классов. Анализ полученных данных свидетельствует о том, что жирно-кислотный состав мембран эритроцитов дает более надежные основания для разделения пациентов с ЖБП и здоровых обследуемых, а в составе жирных кислот сыворотки отмечено значительно больше пересечений липидных метаболитов, что, вероятно, обусловлено вмешательством множества параллельных метаболических процессов.

Данные пилотные результаты свидетельствуют, что уже на уровне жировой болезни печени происходят изменения в составе жирных кислот как в сыворотке, так и в эритроцитах, и они однонаправленны — со снижением содержания ненасыщенных и повышением уровня насыщенных. Определение различий в жирно-кислотном спектре мембран эритроцитов и сыворотки между АЖБП и НАЖБП требует продолжения исследований.

Таким образом, жесткость, вязкость, электрическая проводимость мембраны, индексы агрегации, деструкции эритроцитов увеличиваются, а амплитуда деформации клеток, поляризуемость уменьшаются при АПП.

Липидный и жирно-кислотный состав мембран эритроцитов при алкогольном поражении печени характеризуется увеличением относительного содержания холестериновой фракции, насыщенных жирных кислот и более низким уровнем общих липидов и фосфолипидов, триглицеридов, эфиров холестерина и ненасыщенных жирных кислот (особенно полиненасыщенных — докозотетраеновой, докозогексаеновой)

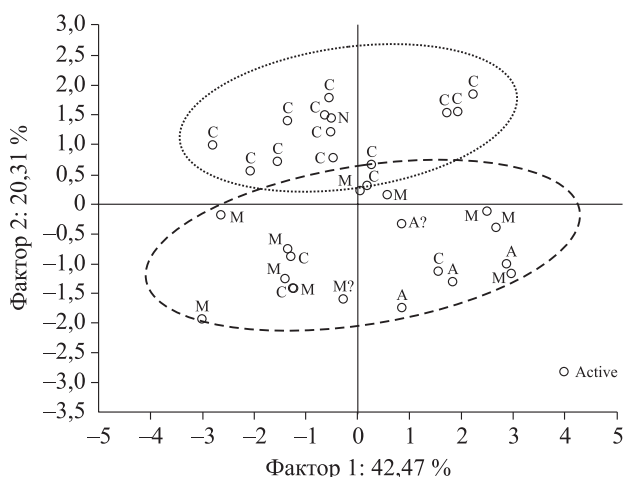


Рис. 1. Расчетный график распределения дифференцирующих жирных кислот в мембранах эритроцитов, построен с использованием данных по с-С12:0, С16:0, С17:0. С18:0, сумме насыщенных жирных кислот, сумме омега-3 жирных кислот, С22:6. Дифференцирующие жирные кислоты для обследуемых обведены на рисунке: штриховой линией — пациенты с ЖБП, пунктиром — мужчины группы сравнения.

С — дифференцирующие метаболиты здоровых лиц; М, А, N — дифференцирующие метаболиты пациентов с жировой болезнью печени (ЖБП)

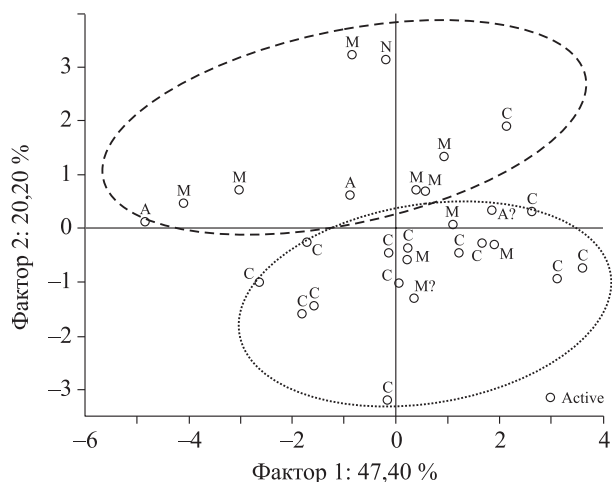


Рис. 2. Расчетный график распределения дифференцирующих жирных кислот в сыворотке крови, построен с использованием данных по с-С16:2, С18:2, С20:0, С20:2, сумме мононенасыщенных, полиненасыщенных, омега-3, омега-6 жирных кислот, соотношению насыщенные/полиненасыщенные жирные кислоты.

Обозн. как на рис. 1

по сравнению с контролем. Соотношение холестерина/фосфолипиды возрастает за счет снижения уровня общих фосфолипидов (за счет уменьшения содержания фракций фосфатидилхолина, фосфатидилсерина, фосфатидилэтаноламина и сфингомиелина, при увеличении относительного содержания лизофракций фосфолипидов).

У пациентов с жировой болезнью печени выявлены однонаправленные изменения спектра жирных кислот в мембранах эритроцитов и сыворотке крови (повышение уровня насыщенных при снижении ненасыщенных).

Полученные корреляции электрических и вязкоупругих характеристик эритроцитов и уровней структурных компонентов мембран позволяют использовать показатели амплитуды деформации эритроцитов под действием НПЭП, вязкости, жесткости, электропроводности мембран, поляризуемости, индекса деструкции для косвенного суждения об уровнях холестериновой фракции, лизофракций, полиненасыщенных жирных кислот в мембранах эритроцитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Schrier S.L. Human erythrocyte membrane enzymes: current status and clinical correlation // *Blood*. 1977. Vol. 50, N 2. P. 227–237.
2. Рекомендации экспертов Всероссийского научного общества кардиологов по диагностике и лечению метаболического синдрома. Второй пересмотр

// Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2009. № 6. С. 1–29.

3. Генералов В.М., Кручинина М.В., Дурьманов А.Г., Медведев А.А., Сафатов А.С., Сергеев А.Н., Буряк Г.А., Курилович С.А., Громов А.А. Диэлектрофорез в диагностике инфекционных и неинфекционных заболеваний. Новосибирск: Изд-во «ЦЭРИС», 2011. 172 с.
4. Кейте М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов: пер. с англ. М.: Мир, 1975. С. 270–271.
5. Исследование системы крови в клинической практике / под ред. Г.И. Козинца, В.А. Макарова. М.: Триада-Х, 1997. 480 с.
6. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А. Физиология и патофизиология эритроцита. Томск: Изд-во Том. ун-та, 2004. 202 с.
7. Геннис Р. Биомембраны: Молекулярная структура и функции. М.: Мир, 1997. 624 с.
8. Подымова С.Д. Болезни печени. М.: Медицина, 2005. 767 с.
9. Маевская М.В. Патогенез алкогольной болезни печени и роль генетической предрасположенности в ее развитии // Клинические перспективы гастроэнтерологии, гепатологии. 2004. Т. 5. С. 2–11.
10. Delaunay J. Molecular basis of red cell membrane disorders // *Acta Haematol*. 2012. Vol. 108, N 4. P. 210–218.
11. Ohvo-Rekila H., Ramstedt B., Leppimaki P., Slotte J.P. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes // *Prog. Lipid Res*. 2002. Vol. 41, N 1. P. 457–468.
12. Hanss M., Koutsourils D. The role of lipids in erythrocyte rheology // *Colloid Surf*. 1985. Vol. 14, N 3–4. P. 261–268.
13. Сторожок С.А., Панченко Л.Ф., Филиппович Ю.Д., Глушков В.С. Изменения физико-химических свойств биологических мембран при развитии толерантности к этанолу // *Вопр. мед. химии*. 2001. № 2. С. 42–51.
14. 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. Vol. 6. P. 1–6.
15. Menon K.V.N., Gores J., Shah V.H. Pathogenesis, diagnosis, and treatment of alcoholic liver disease // *Mayo Clin. Proc*. 2001. Vol. 76. P. 1021–1029.
16. Walsh K., Graeme A. Alcoholic liver disease // *Postgrad. Med. J*. 2000. Vol. 76. P. 280–286.
17. Bouneva I., Abou-Assi S., Heuman D. M., Mihas A.A. Alcoholic liver disease // *Hospital Physician*. 2003. N 10. P. 31–38.
18. Delpero C., Gastaqldi M., Verine A. et al. Structural characteristic of erythrocyte in alcoholic patients // *Alcohol. Clin. Exp. Res*. 1986. Vol. 10, N 6. P. 602–605.
19. Signorini-Allibe N., Gonthier B., Lamarche F., Eyseric H., Barret L. Chronic consumption of ethanol leads to substantial cell damage in cultured rat astrocytes in conditions promoting acetaldehyde accumulation // *Alcohol and Alcoholism*. 2005. Vol. 40, N 3. P. 163–171.
20. Lee S.Y., Park H.J., Best-Popescu C., Jang S., Park Y.K. The Effects of ethanol on the morphologi-

- cal and biochemical properties of individual human red blood cells // *PloS. One*. 2015. Vol. 10. P. 12–15.
21. *Болезни печени и желчевыводящих путей / под ред. В.Т. Ивашкина. М.: Медицина, 2005. 536 с.*
22. **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. Vol. 56, N 2. P. 87–99.
23. **Shiraishi K., Matsuzaki S., Itakura M., Ishida H.** Abnormality in membrane fatty acid compositions of cells measured on erythrocyte in alcoholic liver disease // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 1996. Vol. 20, N 1. P. 56A–59A.

ASSOCIATIONS OF FUNCTIONAL PARAMETERS OF ERYTHROCYTES WITH THE STRUCTURE OF THEIR MEMBRANES IN MEN OF NOVOSIBIRSK WITH ATHEROGENIC DYSLIPIDEMIA AND ALCOHOLIC LIVER DISEASE

M.V. Kruchinina¹, M.V. Parulikova¹, S.A. Kurilovich¹, A.A. Gromov¹, V.M. Generalov², V.A. Richter³, D.V. Semenov³, S.V. Morozov⁴, A.S. Sokolova⁴, N.F. Salakhutdinov⁴, M.V. Shashkov⁵, V.N. Sidelnikov⁵, V.N. Kruchinin⁶

¹ *Institute of Internal and Preventive Medicine – Branch of Federal Research Institute of Cytology and Genetics of SB RAS 630089, Novosibirsk, Boris Bogatkov str., 175/1*

² *State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Well-being, 630559, Koltsovo, Novosibirsk region*

³ *Institute of Bioorganic Chemistry and Fundamental Medicine of SB RAS 630090, Novosibirsk, Academician Lavrentev av., 8*

⁴ *Institute of Organic Chemistry n.a. N.N. Vorozhtsov of SB RAS 630090, Novosibirsk, Academician Lavrentev av., 9*

⁵ *Institute of Catalysis n.a. G.K. Boreskov of SB RAS 630090, Novosibirsk, Academician Lavrentev av., 5*

⁶ *Institute of Semiconductor Physics n.a. A.V. Rzhanov of SB RAS 630090, Novosibirsk, Academician Lavrentev av., 13*

Under supervision there were 151 men (age from 35 till 60 years) with diffuse hepatic diseases (97 with chronic hepatitis, 33 with liver cirrhosis, 21 with fatty liver disease). Alcohol liver disease (ALD) was determined in 66 men. Biochemical and instrumental studies, ultrasonic examination of liver, spleen as well as portal vessels were performed for determination stadia of disease. Moreover, liver biopsy was performed in 19 patients for verification of diagnosis. To all men were carried out inspections of structure-functional erythrocyte characteristics by methods of dielectrophoresis, thin-layer, gas chromatography, GC/MS system. It is experimentally established: rigidity, viscosity, electric conductivity of a membrane of erythrocytes, indexes of aggregation and destruction are increased, but the amplitude of deformation of erythrocytes, polarizability are decreased in ALD. An abnormally high content of cholesterol, saturated fatty acids and low levels of total lipids, phospholipids, triglycerides, ethers of cholesterol, unsaturated fatty acids were found in red cell membranes from patients with ALD. The molar ratio cholesterol/phospholipids was increased at the expense of decreased level of total phospholipids (fractions of phosphatidylcholine, phosphatidylserine, phosphatidylethanolamine and sphingomieline). In patients with fatty liver disease, unidirectional changes in the spectrum of fatty acids in the membranes of erythrocytes and serum (increased level of saturated with decreasing unsaturated) were detected, associations with the manifestations of atherogenic dyslipidemia were established. Correlations between amplitude of deformation of erythrocytes, rigidity, viscosity, electric conductivity of a membrane of erythrocytes, polarizability, index of destruction and levels of total cholesterol, lysophospholipids, polyunsaturated fatty acids in red cells can be used as additional characteristics with a view of early diagnostics of alcoholic liver disease.

Keywords: dielectrophoresis, membrane structure, phospholipids, fatty acids, erythrocyte, alcoholic liver disease, atherogenic dyslipidemia.

*Статья поступила 7 мая 2017 г.,
принята в печать 10 июня 2017 г.*