

ДИЭЛЕКТРОФОРЕЗ ЭРИТРОЦИТОВ: НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ В ДИАГНОСТИКЕ НЕПРЯМЫХ ГИПЕРБИЛИРУБИНЕМИЙ

Маргарита Витальевна КРУЧИННИНА¹, Светлана Арсентьевна КУРИЛОВИЧ¹, Ирина Олеговна СВЕТЛОВА¹, Андрей Александрович ГРОМОВ¹, Владимир Михайлович ГЕНЕРАЛОВ², Талгат Салманович БАКИРОВ²

¹НИИ терапии СО РАМН
630089, г. Новосибирск, ул. Б. Богаткова, 175/1

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

В исследование включено 28 пациентов (мужчины в возрасте от 17 до 67 лет) с непрямыми гипербилирубинемиями (НГБ), 20 из которых (71,4%) наблюдались с диагнозом «синдром Жильбера», оставшиеся — с диагнозом «непрямая гипербилирубинемия неясного генеза». Группу сравнения составили 33 человека сопоставимого возраста. Параметры красной крови определялись стандартными методиками, электрические и вязкоупругие свойства эритроцитов — методом диэлектрофореза в частотном диапазоне $0,05 \cdot 10^6$ – $1 \cdot 10^6$ Гц. Группа больных с непрямыми гипербилирубинемиями неоднородна по поведению эритроцитов в неоднородном переменном электрическом поле. Для пациентов с синдромом Жильбера характерны умеренно сниженная пластичность эритроцитов на фоне слегка повышенных обобщенных показателей вязкости, жесткости, емкости и электропроводности мембран клеток, единичный лизис эритроцитов на низких частотах с последующей умеренно повышенной агрегацией клеток по сравнению с группой контроля и эритроцитарными НГБ, $p < (0,0001-0,05)$. Для пациентов, непрямая гипербилирубинемия которых определяется состоянием эритроцитов, типичны значительно сниженная поляризуемость клеток на всех частотах, резко повышенная склонность к гемолизу и образованию агрегатов при сохраненной или слегка сниженной деформабельности эритроцитов, $p < (0,001-0,02)$. Метод диэлектрофореза эритроцитов может быть использован для дифференциальной диагностики непрямы гипербилирубинемий, оценки эффективности проводимой терапии.

Ключевые слова: непрямы гипербилирубинемии, синдром Жильбера, эритроцит, мембраны, диэлектрофорез.

Непрямы гипербилирубинемии являются собирательным понятием, объединяющим различные нарушения, сопровождающиеся нарастанием содержания в крови неконъюгированного билирубина. В клинической практике сохраняются сложности разграничения этой патологии как с другими диффузными заболеваниями печени, так и между собой, приводя к многочисленным диагностическим ошибкам [1–3]. Ошибочные диагнозы приводят к неправильной оценке прогноза заболевания, подходов к терапии. Поэтому весьма актуальной остается разработка доступных, демонстративных, максимально точных методов диагностики непрямы гипербилирубинемий.

Целью данной работы являлось исследование особенностей электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов методом диэлектрофореза у пациентов с непрямы гипербилирубинемиями и оценка возможности использования этих показателей для дифференциальной диагностики.

Материалы и методы

В исследование включено 28 пациентов (мужчины в возрасте от 17 до 67 лет) с непрямы гипербилирубинемиями, 20 из которых (71,4%) наблюдались с диагнозом «синдром Жильбера», оставшиеся — с диагнозом «непрямая гипербилирубинемия неясного генеза». У 76% обследуемых прослеживался семейный характер болезни. Практически у всех пациентов ухудшение состояния (желтуха, болевой синдром, астеновегетативные расстройства, диспепсические явления) провоцировалось рядом факторов — переохлаждение, физическое, эмоциональное переутомление, вирусные инфекции, прием препаратов, алкоголя и др.

Группу сравнения составили 33 человека сопоставимого возраста, ведущие здоровый образ жизни и употребляющие алкоголь не чаще 1–2 раз в месяц, у которых при обследовании не выявлено признаков заболеваний печени и сердца.

Кручинина М.В. — д.м.н., старш.н.с. лаборатории гастроэнтерологии, e-mail: kruchmargo@yandex.ru

Курилович С.А. — зав. лабораторией гастроэнтерологии, e-mail: kurilovich@yandex.ru

Светлова И.О. — доцент кафедры терапии факультета повышения квалификации и постдипломной переподготовки врачей, e-mail: isvetlova@ngs.ru

Громов А.А. — старш.н.с. клинко-диагностической лаборатории

Генералов В.М. — д.б.н., вед.н.с., e-mail: general@vector.nsk.ru

Бакиров Т.С. — д.б.н., вед.н.с., зав. лабораторией экспериментальной азробиологии, e-mail: bakirov@vector.nsk.ru

Обследование выполнено с одобрения комитета биомедицинской этики ГУ НИИ терапии СО РАМН. Все обследуемые заполняли стандартные анкеты: 1) информированное согласие пациента на участие в обследовании; 2) стандартную анкету о потреблении алкоголя. У больных с диагнозом НГБ, а также у мужчин группы сравнения исследованы электрические и вязкоупругие параметры эритроцитов методом диэлектрофореза (патент на изобретение № 2296327 от 30.08.2004).

Всем пациентам выполнены биохимические и инструментальные исследования, ультразвуковое исследование печени, селезенки, а также порталных сосудов. Вирусная этиология заболевания была исключена на основании отсутствия серологических маркеров, определяемых методом иммуноферментного анализа (ИФА), и (или) ДНК и РНК вирусов, определяемых методом полимеразной цепной реакции, а алкогольная — при отрицательных результатах ИФА сывороточных маркеров вирусных гепатитов и достоверно подтвержденном отсутствии систематического потребления алкоголя.

Исследовали показатели красной крови. Количество эритроцитов в 1 мкл измеряли унифицированным методом автоматического подсчета эритроцитов на анализаторе «Лабор-скель» («Медикор», ВНР). Общее содержание гемоглобина определяли гемоглобинцианидным методом фотометрически с помощью стандартных наборов «Реахим» (СССР). Цветовой показатель определяли по стандартным формулам, подсчет количества ретикулоцитов производился при помощи люминесцентной микроскопии.

По данным биохимических исследований у пациентов с не прямой гипербилирубинемией уровни общего билирубина составляли от 28,5 до 57,6 мкмоль/л с преобладанием не прямой фракции (при этом билирубинурия отсутствовала, количество уробилиновых тел в кале и моче было не изменено), отмечены переходящие субнормальные повышения активности аспартат- и аланинаминотрансферазы, белковые осадочные пробы, содержание протромбина были не изменены.

Увеличение размеров печени отмечено у 18 пациентов (64,3% случаев) (печень выступала из-под правого подреберья по срединно-ключичной линии на 1,5–3 см). Фиброз печени в группе сравнения принимался за нулевую стадию (F0), у большинства пациентов соответствовал легкой степени (F1–F2) (пальпаторно, по данным УЗИ). Спленомегалия не была выявлена.

Для проведения исследований методом диэлектрофореза кровь объемом 2 мл забирали вакутайнерами в 3,7% цитратный буфер в соотношении 9:1, через 1 час кровь вносили в 0,3 М раствор сахарозы (рН 7,36) в соотношении 1:20. Сразу после разведения эритроцитов производились измерения. В измерительной ячейке на клетки воздействовали 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, индексы деструкции и агрегации, амплитуду деформации эритроцитов, емкость мембран эритроцитов, скорость движения клеток к электродам, положение равновесной частоты. Для распознавания образа клеток и компьютерной обработки данных использовался пакет оригинальных программ CELLFIND. Ошибка воспроизводимости метода — 7–12%.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы SPSS v.10, вычисляли среднее арифметическое значение (M), ошибку среднего арифметического значения (m). Взаимосвязь между параметрами анализировали с помощью коэффициента корреляции Пирсона, достоверность различий показателей оценивали с помощью критериев Стьюдента, χ^2 и считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования

Показатели красной крови у больных с НГБ отличались более низким, чем в группе сравнения, количеством эритроцитов ($(4,39 \pm 0,084) \cdot 10^{12}/л$ против $(4,51 \pm 0,045) \cdot 10^{12}/л$, $p > 0,10$), уровнем гемоглобина ($143,3 \pm 1,78$ против $147,9 \pm 1,80$ г/л, $p < 0,10$), цветовым показателем ($0,94 \pm 0,0095$ против $0,96 \pm 0,0062$, $p < 0,10$), более высоким количеством ретикулоцитов ($8,5 \pm 0,71$ против $7,8 \pm 0,22$ ‰, $p > 0,10$), хотя уровни достоверности эти различия не достигали.

Наблюдения за характером поведения эритроцитов в НПЭП показали, что клетки обследуемых группы сравнения на частотах $0,5 \cdot 10^6$, $1 \cdot 10^6$ Гц обнаружили ярко выраженную способность к деформации (рис.). Они приобретали высокую поступательную скорость в сторону ближайшего электрода и вытягивались в максимальной степени, демонстрируя высокую пластичность. У большей части обследоуе-

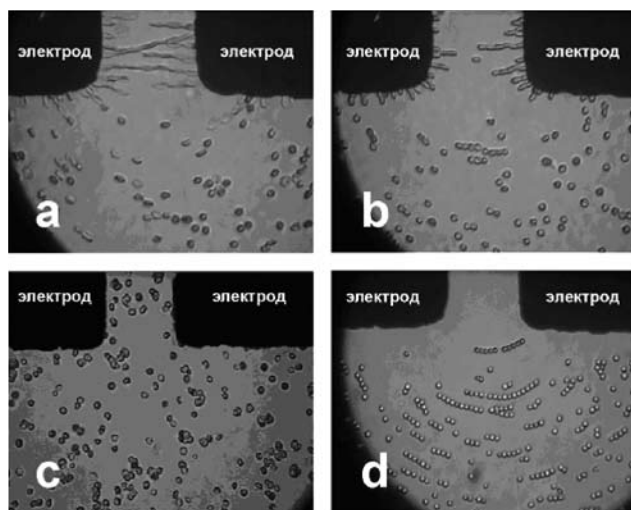


Рис. Разделение и деформация эритроцитов у лиц группы сравнения (а), больных первой подгруппы с непрямыми гипербилирубинемиями (b) и второй подгруппы с непрямыми гипербилирубинемиями (с) в неоднородном переменном электрическом поле при частотах: а, b, с — 1 МГц; d — 0,1 МГц.

мых в частотном диапазоне $(0,45-0,5) \cdot 10^6$ Гц отмечена аксиальная ротация эритроцитов, что соответствует положению равновесной частоты. На частотах $0,05 \cdot 10^6$, $0,1 \cdot 10^6$ Гц деформации не наблюдалось, эритроциты отталкивались от электродов, единичные клетки под действием электрического поля разрушались. Показатели поляризуемости на всех частотах, амплитуда деформации эритроцитов под действием НПЭП, скорость движения клеток к электродам были достоверно выше, а электропроводность, емкость мембран, обобщенные показатели вязкости, жесткости, индексы агрегации и деструкции — ниже в группе здоровых лиц по сравнению с пациентами с непрямыми гипербилирубинемиями, $p < (0,0001-0,05)$ (табл.).

При проведении исследования методом диэлектрофореза группа больных с непрямыми гипербилирубинемиями оказалась неоднородной по характеру поведения эритроцитов под действием НПЭП. Анализ полученных данных позволил выделить две подгруппы пациентов с НГБ.

В первой подгруппе оказалось 13 человек. У этих пациентов выявлены достоверно более выраженные отличия от группы сравнения по параметрам эритроцитов, чем в общей группе больных с НГБ: эритроциты имели меньшие размеры, были более жесткими, с меньшей пластичностью, с более высокими показате-

лями электропроводности и емкости мембран, они медленно двигались к электродам и имели существенно смещенную в высокочастотный диапазон равновесную частоту, $p < (0,0001-0,02)$ (табл.).

По сравнению со второй подгруппой у данных пациентов отмечены более высокие обобщенные показатели жесткости $((7,19 \pm 0,49) \cdot 10^{-6}$ против $(5,6 \pm 0,4) \cdot 10^{-6}$ Н/м, $p < 0,01$), вязкости $(0,59 \pm 0,06$ против $0,41 \pm 0,04$ Па·с, $p < 0,02$), электропроводности $((7,08 \pm 1,29) \cdot 10^{-5}$ против $(3,87 \pm 0,21) \cdot 10^{-5}$ Ом $^{-1}$ м $^{-1}$, $p < 0,02$), электрической емкости мембран эритроцитов $((6,19 \pm 0,59) \cdot 10^{-14}$ против $(4,17 \pm 0,41) \cdot 10^{-14}$ Ф, $p < 0,01$) при сниженных показателях среднего диаметра клетки $((6,64 \pm 0,21) \cdot 10^{-6}$ против $(7,16 \pm 0,20) \cdot 10^{-6}$ м, $p < 0,05$), амплитуды деформации эритроцитов $((0,98 \pm 0,12) \cdot 10^{-6}$ против $(2,07 \pm 0,14) \cdot 10^{-6}$ м, $p < 0,0001$) (рис.), скорости движения эритроцитов к электродам $(6,37 \pm 1,68$ против $12,57 \pm 1,54$ мкм/с, $p < 0,01$). Умеренный или слегка повышенный лизис эритроцитов наблюдался лишь на низких частотах $(0,05 \cdot 10^6, 0,1 \cdot 10^6$ Гц). Равновесная частота была смещена в высокочастотный диапазон, $(0,55-0,6) \cdot 10^6$ Гц.

Вторая подгруппа пациентов (15 человек) в меньшей степени по электрическим и вязкоупругим характеристикам эритроцитов отличалась от здоровых лиц. Эритроциты у мужчин данной подгруппы обладали достаточной скоростью движения к электродам, под действием электрического поля клетки хорошо деформировались, аксиальная ротация эритроцитов наблюдалась на близкой к группе сравнения частоте, однако степень лизиса и агрегации эритроцитов была существенно выше ($p < 0,0001$).

Пациенты второй подгруппы по сравнению с пациентами первой подгруппы демонстрировали несколько сниженные показатели пластичности эритроцитов на фоне умеренно или слегка повышенных обобщенных показателей жесткости и вязкости, электропроводности. Они сочетались со значительно сниженными уровнями поляризуемости $((0,43 \pm 0,14) \cdot 10^{-15}$ против $(1,10 \pm 0,27) \cdot 10^{-15}$ м 3 , $p < 0,02$), электрической емкости мембран клеток и резко повышенными значениями индекса деструкции эритроцитов под действием неоднородного переменного электрического поля (рис.) $(6,56 \pm 0,44$ против $2,41 \pm 0,43\%$, $p < 0,0001$) и индекса агрегации $(0,64 \pm 0,05$ против $0,45 \pm 0,033$ усл. ед., $p < 0,01$). Следует отметить,

что выраженный гемолиз эритроцитов у этих пациентов отмечен на всех частотах исследуемого диапазона. Скорость движения к электродам при этом была достаточной. Равновесная частота оказалась смещенной в низкочастотный диапазон, $(0,20-0,35) \cdot 10^6$ Гц (табл.).

Анализ показателей красной крови в выделенных подгруппах пациентов с НГБ позволил выявить тенденции к снижению количества эритроцитов, уровня гемоглобина, цветового показателя при достоверно более высоком количестве ретикулоцитов у больных второй подгруппы по сравнению с первой ($9,8 \pm 0,67$ против $5,6 \pm 0,93$ ‰, $p < 0,001$).

Во второй подгруппе пациентов с непрямыми гипербилирубинемиями обнаружены обратные корреляции величин индексов агрегации и деструкции на высоких и низких частотах с количеством эритроцитов (при высокой частоте, 10^6 Гц, $r = -0,432$, $p < 0,05$ для индекса

агрегации и $r = -0,621$, $p < 0,02$ для индекса деструкции; при низкой частоте, $0,05 \cdot 10^5$ Гц, $r = -0,532$, $p < 0,033$ для индекса агрегации и $r = -0,681$, $p < 0,01$ для индекса деструкции) и прямые — с уровнем ретикулоцитов (при частоте 10^6 Гц $r = +0,311$, $p < 0,05$ для индекса агрегации и $r = +0,475$, $p < 0,02$ для индекса деструкции). Выявлены прямые корреляции на высокой частоте, $0,5 \cdot 10^5$ Гц, уровня непрямого билирубина с индексом деструкции ($r = +0,571$, $p < 0,01$) и с индексом агрегации ($r = +0,402$, $p < 0,02$).

Обсуждение

Проведенное исследование убедительно доказывает: появился новый метод дифференциальной диагностики не прямых гипербилирубинемий, который дает возможность быстро, в реальном масштабе времени, с минимальными затратами, демонстративно определить источник непрямого билирубина. Весьма пока-

Вязкоупругие и электрические характеристики эритроцитов у больных с непрямыми гипербилирубинемиями и в группе сравнения ($M \pm m$)

Таблица

| Характеристики эритроцитов | Группа сравнения | Больные с непрямыми гипербилирубинемиями | | |
|---|------------------|--|--|--|
| | | Общая группа | Первая подгруппа | Вторая подгруппа |
| Средний диаметр, $\cdot 10^{-6}$ м | $7,30 \pm 0,13$ | $7,06 \pm 0,17$ | $6,64 \pm 0,21^{**}$ | $7,16 \pm 0,20^{\#}$ |
| Поляризуемость при 106 МГц, $\cdot 10^{-15}$ м ³ | $1,6 \pm 0,32$ | $0,87 \pm 0,14^*$ | $1,1 \pm 0,27$ | $0,43 \pm 0,14^{***\wedge\#\#}$ |
| Обобщенный показатель жесткости, $\cdot 10^{-6}$ Н/м | $4,2 \pm 0,6$ | $6,3 \pm 0,5^{***}$ | $7,19 \pm 0,49^{****}$ | $5,6 \pm 0,4^{*###}$ |
| Обобщенный показатель вязкости, Па \cdot с | $0,32 \pm 0,05$ | $0,51 \pm 0,05^{***}$ | $0,59 \pm 0,06^{****}$ | $0,41 \pm 0,04^{\#\#}$ |
| Амплитуда деформации эритроцитов 106 МГц, $\cdot 10^{-6}$ м | $2,6 \pm 0,1$ | $1,9 \pm 0,1^{****}$ | $0,98 \pm 0,12^{****\wedge\wedge\wedge}$ | $2,07 \pm 0,14^{*####}$ |
| Электропроводность, $\cdot 10^{-5}$ см/м | $2,91 \pm 0,30$ | $5,57 \pm 0,12^*$ | $7,08 \pm 0,13^{****}$ | $3,87 \pm 0,21^{*##}$ |
| Скорость движения эритроцитов к электродам, мкм/с | $14,70 \pm 2,34$ | $9,04 \pm 1,45^*$ | $6,37 \pm 1,68^{***}$ | $12,57 \pm 1,54^{\#\#\#}$ |
| Емкость клеточной мембраны, $\cdot 10^{-14}$ Ф | $3,18 \pm 0,22$ | $5,05 \pm 0,62^{***}$ | $6,19 \pm 0,59^{****}$ | $4,17 \pm 0,41^{*###}$ |
| Положение равновесной частоты, $\cdot 10^5$ Гц | $4,65 \pm 0,46$ | $5,73 \pm 0,40^{****}$ | $6,37 \pm 0,25^{***\wedge}$ | $3,97 \pm 0,39^{\wedge\wedge\wedge\#\#\#}$ |
| Индекс агрегации эритроцитов, усл.ед. | $0,42 \pm 0,01$ | $0,57 \pm 0,07^{****}$ | $0,45 \pm 0,03$ | $0,64 \pm 0,054^{****###}$ |
| Индекс деструкции эритроцитов, % | $1,09 \pm 0,72$ | $3,87 \pm 0,51^{***}$ | $2,41 \pm 0,43^{\wedge}$ | $6,56 \pm 0,44^{****\wedge\wedge\wedge\#\#\#}$ |

Примечание: Достоверность отличия: * — от группы сравнения (* — $p < 0,05$, ** — $p < 0,02$, *** — $p < 0,01$, **** — $p < 0,0001$); ^ — от общей группы больных с непрямыми гипербилирубинемиями (^ — $p < 0,05$, ^^ — $p < 0,02$, ^^ — $p < 0,01$, ^^ — $p < 0,0001$); # — от первой подгруппы больных с непрямыми гипербилирубинемиями (# — $p < 0,05$, ## — $p < 0,02$, ### — $p < 0,01$, #### — $p < 0,0001$).

зательно то, что практически все пациенты длительное время наблюдались у врачей с диагнозом «синдром Жильбера», предполагающим наличие дефекта фермента глюкуронилтрансферазы в мембранах гепатоцитов. В настоящем исследовании это пациенты первой подгруппы. У них вязкоупругие и электрические характеристики эритроцитов также отличаются от таковых у здоровых лиц. Это неудивительно, поскольку синтез мембранных белков находится под общим генетическим контролем, наличие дефекта в мембранах клеток одних органов (в данном случае печени) с большой долей вероятности предполагает наличие изменений белкового каркаса других мембран (в частности, эритроцитов) [4, 5]. В данной подгруппе совокупность параметров эритроцитов находилась в диапазоне дискриминирующих значений, отражающих легкую, умеренную степень фиброза (FI–FII), как выявлено в наших предшествующих исследованиях [6]. Это можно объяснить тем, что при синдроме Жильбера накопление в печеночных клетках пигмента липофусцина нередко сочетается с развитием мелкокапельной жировой дистрофии, причем периодически идет интенсивное накопление пигмента [3].

Наиболее интересной находкой является факт, что у 53,6% пациентов, в том числе с диагнозом «синдром Жильбера», «повинными» в повышенном уровне непрямого билирубина оказались эритроциты. Они имели признаки сниженной жизнеспособности с явлениями энергетического дефицита в виде значительно сниженной поляризуемости на всех частотах, емкости мембран (что отражает уменьшение их толщины со снижением поверхностного электрического заряда), смещения равновесной частоты в низкочастотную область. Следствием этого является сниженная резистентность эритроцитов, которая приводит к легкому разрушению клеток при стрессах различной интенсивности (в данном случае, моделью такого явления служит использование различных частот электрического поля и наблюдаемый при этом лизис клеток). Отсюда высокие уровни индекса деструкции на всех частотах и высокие уровни индекса агрегации, поскольку высвобождающийся при разрушении эритроцитов АДФ представляет собой мощный индуктор образования агрегатов, в том числе и лейкоцитарно-тромбоцитарных [7].

Истощение АТФ в эритроцитах приводит к ряду нарушений, в том числе к блокированию ионных насосов и изменению ионного баланса в системе «среда-клетка». Это способствует снижению отношения площади поверхности

к объему эритроцитов и изменению морфологии клеток, что, в свою очередь, затрудняет транспорт кислорода из эритроцита в ткани и усугубляет гипоксию, которая стимулирует фиброгенез в печени [8, 9].

Особый интерес представляет явление сниженной резистентности эритроцитов. Она может быть генетически детерминирована, что предполагает сбой в костномозговом синтезе какого-либо из белков, фосфолипидов эритроцитов или синтез его альтернативными путями. Предполагается, что в системе костномозгового синтеза эритроцитов присутствует фермент более низкой активностью. Вне нагрузки, действия провоцирующих факторов эта аномалия может себя не проявлять, но в случаях хронического стрессового воздействия, когда наблюдается напряжение эритропоэза, срыв происходит именно в таком «слабом» звене. В предположениях такого рода нет ничего, что противоречило бы здравому смыслу и уже известным фактам: так, именно наличием минорных, «слабых» в функциональном отношении форм трансфераз гепатоцитов объясняются синдромы Ротора, Дабина-Джонсона, Жильбера [2, 3]. Во всех этих случаях желтуха развивается как ответ на любой внешний агент, будь то прием лекарственных препаратов, алкоголя или инфекционное заболевание.

Возможно, сниженная резистентность эритроцитов является приобретенной, когда под воздействием эндо- или экзогенных причин происходит хроническое раздражение красного кровяного ростка, в ходе чего происходит ускоренный, недостаточно «эффективный» эритропоэз. Эритроциты в этом случае проходят не 10 стадий созревания, а только пять или семь с выбросом на периферию неполноценных клеток с тонкими мембранами, имеющими измененный состав поверхностных структур, в частности, с высоким уровнем карбоксильных групп. Измененная поверхностная структура воспринимается иммунокомпетентными клетками как подлежащая извлечению из кровотока. Поэтому подобные клетки являются «короткоживущими», со склонностью к лизису [7].

Следует отметить, что дифференциальный диагноз при синдроме Жильбера в первую очередь проводят с гемолитическими желтухами, преимущественно наследственным микросфероцитозом [1–3]. Наблюдаемые при этом заболевании характерные признаки в виде спленомегалии, умеренной анемии, изменения морфологии эритроцитов, сдвига кривой Прайс-Джонса, повышенной экскреции уробилиновых тел у пациентов второй подгруппы в нашем исследовании не отмечены.

Наблюдаемые в исследовании изменения электрических и вязкоупругих характеристик эритроцитов, возможно, являются и отражением воздействия непрямого билирубина на мембраны клеток. Так, исследованиями М.А. Brito et al. [10] установлено, что неконъюгированный билирубин в нарастающей степени связывается с эритроцитами, образуя комплекс с альбумином, что приводит к токсическим проявлениям, кульминацией которых является лизис эритроцитов. Билирубин, воздействуя на эритроцитарную мембрану, способствует высвобождению мембранного холестерина и нарушению мембранной асимметрии фосфолипидов. В ходе этого фосфатидилэтаноламин и фосфатидилсерин, фосфолипиды внутренней поверхности мембраны, оказываются на ее наружной поверхности. Как указывают авторы [10], эти изменения могут приводить к гемолизу и эритрофагоцитозу, способствуя таким образом увеличению продукции билирубина и развитию анемии.

Подобные находки в отношении мембранных изменений, вызванных неконъюгированным билирубином, имеют весьма важное значение в свете сообщений Todd S. Perlstein et al. [11] о том, что продукция билирубина может быть важным эндогенным защитным механизмом против заболеваний, при которых воспаление и (или) окислительный стресс действуют одновременно. Была установлена более низкая распространенность заболевания периферических артерий среди людей с более высоким содержанием в крови билирубина, чем среди пациентов с более низкими уровнями билирубина. Авторы установили, что пациенты с синдромом Жильбера имеют распространенность заболевания коронарных артерий 2% по сравнению с распространенностью 12% в популяции в целом. При этом генетическое изменение, вызывающее синдром Жильбера, ассоциируется с в высшей степени низким риском сердечно-сосудистых заболеваний, что объясняется статистически более высоким уровнем билирубина.

Почему подобная дифференцировка не прямых гипербилирубинемий является важной? Она определяет подходы к дальнейшей углубленной диагностике и терапии. В случаях подтвержденного синдрома Жильбера это традиционные рекомендации по соблюдению диеты, режима труда и отдыха, назначению витаминов группы В, возможно, препаратов, индуцирующих синтез ферментов, осуществляющих конъюгацию билирубина. Если высокие уровни непрямого билирубина определяются состоянием эритроцитов, то, с одной стороны,

это поиск эндо- и (или) экзогенных раздражающих, токсических факторов, с другой стороны — определение дефектного белка, фосфолипида эритроцитов. Для стабилизации ситуации на периферии возможно назначение эссенциальных фосфолипидов (как средства стабилизации мембран), препаратов магния (для активации работы Na,K-магний-зависимого мембранного насоса), препаратов коэнзима Q₁₀ (для снижения дефицита макроэргических соединений эритроцитов), препаратов дикверцетина с целью уменьшения образования агрегатов, улучшения пластичности клеток.

Выводы

1. У пациентов с непрямыми гипербилирубинемиями показатели поляризуемости на всех частотах, амплитуда деформации эритроцитов, скорость движения клеток к электродам достоверно ниже, а электропроводность, емкость мембран, обобщенные показатели вязкости, жесткости, индексы агрегации и деструкции — выше, чем у здоровых обследуемых.

2. Группа больных с непрямыми гипербилирубинемиями неоднородна по поведению эритроцитов в неоднородном переменном электрическом поле.

3. Пациенты с синдромом Жильбера в сравнении с больными, непрямыми гипербилирубинемия которых определяется состоянием клеток красной крови, имеют эритроциты с достоверно более высокими показателями поляризуемости, электропроводности, емкости мембран, вязкости, жесткости, положения равновесной частоты при достоверно более низких показателях среднего диаметра клеток, пластичности, скорости движения эритроцитов к электродам, индексов агрегации и деструкции под действием неоднородного переменного электрического поля.

4. Метод диэлектрофореза может быть использован для дифференциальной диагностики не прямых гипербилирубинемий.

5. Необходимы дальнейшие исследования проблемы, в т.ч. оценка состояния мембран эритроцитов и генетического полиморфизма уридиндифосфатглюкуронилтрансферазы (УДФ-ГТ) в подгруппах пациентов с непрямыми гипербилирубинемиями с разным поведением эритроцитов в неоднородном переменном электрическом поле.

Литература

1. *Ивашкин Н.Т.* Болезни печени и желчевыводящих путей. Руководство для врачей. М.: Вести, 2002. 451 с.
2. *Ivashkin N.T.* Diseases of liver and biliary ducts. Guide for physicians. М.: Vesti, 2002. 451 p.

2. Панфилов С.А., Панфилова Е.В. Диагностика заболеваний печени, билиарного тракта с курсом патологической анатомии. М.: БИНОМ—Лаборатория знаний, 2003. 342 с.
Panfilov S.A., Panfilova E.V. Diagnostics of liver diseases, biliary ducts with course of pathologic anatomy. M.: BINOM—Laboratorija znaniy, 2003. 342 p.
3. Подымова С.Д. Болезни печени. М.: Медицина, 1993. 544 с.
Podymova S.D. Liver diseases. M.: Meditsina, 1993. 544 p.
4. Мембраны и болезнь / Под ред. Л. Болис, Д.Ф. Хоффман, А. Лиф. М.: Медицина. 1980. 408 с.
Membranes and disease / Eds. L. Bolis, D.F. Hoffman, A. Liff. M.: Meditsina. 1980. 408 p.
5. Геннис Р.Б. Биомембраны: молекулярная структура и функция. М.: Мир, 1997. 431 с.
Gennis R.B. Biomembranes: molecular structure and function. M.: Mir, 1997. 624 p.
6. Кручинина М.В., Курилович С.А., Паруликова М.В. и др. Вязкоупругие и электрические характеристики эритроцитов при различной степени фиброза печени // Вестник НГУ. 2005. 3. (4). 43–52.
Kruchinina M.V., Kurilovich S.A., Parulikova M.V. et al. Viscoselastic and electrical characteristics of erythrocytes at the different stages of liver fibroses // Vestnik NGU. 2005. 3. (4). 43–52.
7. Исследование системы крови в клинической практике / Под ред. Г.И. Козинца, В.А. Макарова. М.: Триада-Х, 1997. 480 с.
Research of blood system in clinical practice / Ed. G.I. Kozinets, V.A. Makarov. M.: Triada-X, 1997. 480 p.
8. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степная Е.А. Физиология и патофизиология эритроцита. Томск: Изд-во ТГУ, 2004. 202 с.
Novitskii V.V., Ryazantseva N.V., Stepovaya E.A. Physiology and pathophysiology of erythrocyte. Tomsk: Izd-vo TGU, 2004. 202 p.
9. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. и др. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. М.: Слово, 2006. 553 с.
Menshikova E.B., Lankin V.Z., Zenkov N.K. et al. Oxidative stress. Prooxidants and antioxidants. M.: Slovo, 2006. 553 p.
10. Brito M.A., Silva R.F.M., Brites D. Bilirubin induces loss of membrane lipids and exposure of phosphatidylserine in human erythrocytes // J. Cell Biol. Toxicol. 2002. 18. 181–192.
11. Perlstein T.S., Pande R.L., Beckman J.A., Creager M.A. Serum total bilirubin level and prevalent lower-extremity peripheral arterial disease: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999 to 2004 // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2008. 28. (1). 166–172.

DIELECTROPHORESIS OF ERYTHROCYTES: NEW POSSIBILITY IN DIAGNOSIS OF INDIRECT HYPERBILIRUBINEMIA

Margarita Vitalievna KRUCHININA¹, Svetlana Arsent'yevna KURILOVICH¹, Irina Olegovna SVETLOVA¹, Andrey Aleksandrovich GROMOV¹, Vladimir Mihailovich GENERALOV², Talgat Salmanovich BAKIROV²

¹Institute of Internal Medicine SB RAMS
175/1, Boris Bogatkov st., Novosibirsk, 630089

²Institute of Aerobiology, SRC VB Vector
Koltsovo, Novosibirsk region, 630559

Under supervision there were 28 men (age from 17 till 67 years) with indirect hyperbilirubinemia (IHB) (20 with Gilbert's syndrome and 8 with IHB unclear genesis) and 33 conventionally healthy men. To all men were carried out inspections of red cell parameters by standard techniques, structure-functional erythrocyte characteristics by methods of dielectrophoresis at frequency region $0,05 \cdot 10^6 - 10^6$ Hz. Is experimentally established: groups of the patients with IHB had got erythrocytes with different behavior in the nonuniform alternating electric field. The patients with Gilbert's syndrome had got erythrocytes with moderate decreased amplitude of deformation, slightly increased levels of rigidity, viscosity, electric conductivity, capacity of a membranes, indexes of agregation and destruction compared with control group and hemolytic IHB patients, $p < (0,0001-0,05)$. The patients with IHB, connected with erythrocyte condition, had got considerably decreased polarizability at all frequencies of electric field, sharply increased indexes of aggregation and destruction and normal or slightly decreased amplitude of cell deformation, $p < (0,001-0,02)$. Therefore, dielectrophoresis of erythrocytes can be used for diagnosis of indirect hyperbilirubinemia, evaluation effectiveness of the therapy.

Key words: indirect hyperbilirubinemia, Gilbert's syndrome, erythrocyte, membranes, dielectrophoresis.

Kruchinina M.V. — MD, PhD, Main Scientific Researcher, e-mail: kruchmargo@yandex.ru

Kurilovich S.A. — MD, PhD, professor, chief of the gastroenterology department, e-mail: kurilovich@iimed.ru

Svetlova I.O. — Associated Professor of cathedra of Internal Medicine of Post-Graduate Education, e-mail: isvetlova@ngs.ru

Gromov A.A. — Main Scientific Researcher

Generalov V.M. — leading scientific researcher, e-mail general@vector.nsk.ru

Bakirov T.S. — Leading scientific researcher, head of experimental aerobiology laboratory, e-mail bakirov@vector.nsk.ru