

**М.В. Кручинина^{1*}, М.И. Воевода¹, С.А. Курилович¹, А.А. Громов¹, В.А. Баум¹,
Е.Г. Немцова¹, Е.В. Логвиненко¹, Н.А. Ковалькова¹, В.М. Генералов²,
Б.Н. Зайцев², В.Н. Кручинин³, С.В. Рыхлицкий³, Б.А. Князев⁴,
В.В. Герасимов⁴, А.Г. Покровский⁴, В.О. Пустыльняк⁴, С.В. Чересиз⁴,
Г.Р. Сакаева⁴, А.И. Корбут⁴, В.Д. Анцыгин⁵**

¹ ФГБУ «НИИ терапии и профилактической медицины» СО РАМН, г. Новосибирск

² ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», п. Кольцово, Новосибирская область

³ ФГБУН «Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова», г. Новосибирск

⁴ ФГБОУ ВПО «Новосибирский государственный университет»

⁵ ФГБУН «Институт автоматизации и электрометрии», г. Новосибирск

ИЗМЕНЕНИЯ ОПТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ЦИРРОЗАМИ ПЕЧЕНИ РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ

Резюме

Исследованы оптические параметры эритроцитов и сыворотки крови у пациентов с различными классами ЦП по Чайлд–Пью методами атомно-силовой микроскопии, диэлектрофореза, спектральной эллипсометрии, терагерцовой и Raman-спектроскопии. Выявлено, что по мере нарастания класса цирроза увеличивается уровень деформированных форм клеток с изменённым рельефом мембран со снижением мощности пропускания терагерцового излучения взвесью эритроцитов. Из вязкоупругих и электрических параметров эритроцитов обобщённый показатель вязкости, относительная поляризуемость, электропроводность, ёмкость клеточной мембраны, положение равновесной частоты оказались наиболее значимы для определения степени тяжести ЦП. Нарастание декомпенсации цирроза приводит к снижению толщины тонких плёнок, полученных из сыворотки крови, с повышением их показателя преломления, гетерогенности структуры. При этом отмечено достоверное снижение площадей пиков поглощения Raman-спектров при 1005, 1157 и 1520 см⁻¹.

Ключевые слова: цирроз печени, класс по Чайлд–Пью, оптические параметры, эритроциты, сыворотка.

Abstract

The optical parameters of red blood cells and serum from patients with different classes of liver cirrhosis by Child–Pugh were examined by atomic force microscopy, dielectrophoresis, spectral ellipsometry, terahertz and Raman-spectroscopy. We found that with the growth of the class of cirrhosis the level of the deformed shapes of cells with altered membrane relief was increased and transmission power terahertz suspension of erythrocytes was reduced. Among the viscoelastic and electrical parameters of erythrocytes some characteristics (summary measures of viscosity, the relative polarizability, electrical conductivity, the capacity of the cell membrane, the position of the crossover frequency) were the most important for determining the severity of liver cirrhosis. The growth of decompensation of cirrhosis resulted in lower the thickness of thin films prepared from the serum, with the rise of the refractive index and heterogeneous structure. At the same time, we observed a significant decrease of the peak areas of the absorption Raman- spectra at 1005, 1157 and 1520 cm⁻¹.

Key words: liver cirrhosis, class Child–Pugh, the optical parameters, erythrocytes, serum.

ЦП — цирроз печени.

Прогноз заболевания при развитии ЦП во многом зависит от развития осложнений. Больные компенсированным ЦП могут прожить сравнительно долго, если не наступит декомпенсация. При компенсированном циррозе 10-летняя выживаемость составляет 47%, а при декомпенсации 5-летняя выживаемость только 16%. Многие гепатологи используют классификацию степени тяжести ЦП по Чайлд–Пью, которая предполагает оценку выраженности асцита, энцефалопатии, уровней билирубина, альбумина, протромбинового времени. Класс ЦП яв-

ляется обязательной при верификации диагноза. Вместе с тем на основании этих данных можно прогнозировать риск возникновения кровотечения из варикозно расширенных вен пищевода при циррозе, риск использования общего наркоза и операционную смертность [6]. Данные ранее проведённых исследований продемонстрировали перспективность использования оптических методов исследования эритроцитов и сыворотки крови для определения степени фиброза печени, этиологии процесса, его биохимической активности [2, 4, 7]. Оптиче-

*Контакты. E-mail: kruchmargo@yandex.ru. Телефон: (383) 267-97-55

ские методы занимают особое место в биомедицинских исследованиях, благодаря высокой чувствительности, неразрушающему и невозмущающему характеру воздействия на исследуемый объект [14]. Сочетанное использование вышеуказанных методик, включая терагерцовую спектроскопию, атомно-силовую микроскопию, эллипсометрию, позволило достичь определённых успехов в разграничении стадий процесса.

Цель исследования: изучить возможности оптических методов исследования эритроцитов, сыворотки крови у пациентов с ЦП разной степени тяжести.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Группы обследуемых

Обследовано 46 мужчин в возрасте от 47 до 66 лет с ЦП различного генеза: ЦП, вызванный HBV, – 13 пациентов; ЦП, вызванный HCV, – 10 человек; ЦП, вызванный вирусами HBV + HCV, – 7 больных, в том числе 16 пациентов, у которых хроническая вирусная инфекция протекала на фоне алкогольной интоксикации; алкогольный генез ЦП — у 14 человек; у 2 пациентов ЦП был расценен как криптогенный. Вирусная этиология болезни устанавливалась на основании обнаружения серологических маркёров и (или) ДНК и РНК вирусов, а алкогольная — при отрицательных результатах ИФА сывороточных маркёров инфицирования вирусами гепатитов и достоверно подтвержденном систематическом длительном потреблении алкоголя в гепатотоксических дозах. Стадия болезни определялась на основании клинических, биохимических и инструментальных исследований, у 19 больных выполнена биопсия печени. Степень компенсации ЦП соответствовала классу А по Чайлд–Пью у 12, В — у 25, С — у 9 больных. Группу сравнения составили практически здоровые мужчины (33 человека) в возрасте от 35 до 60 лет, ведущие здоровый образ жизни и употребляющие алкоголь не чаще 1–2-х раз в месяц в умеренных дозах, у которых при клиническом, лабораторном и инструментальном обследовании не выявлено признаков заболевания печени, другой патологии внутренних органов. Обследование выполнено с одобрения Этического комитета ФГБУ «НИИ терапии» СО РАМН от 18 сентября 2012 г., протокол № 36. Все обследуемые подписали информированные согласия на участие в исследованиях.

Диэлектрофорез эритроцитов в неоднородном переменном электрическом поле

Обследуемым проведено изучение электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов методом диэлектрофореза ДЭФ в неоднородном переменном электрическом поле в частотном диапазоне $5 \cdot 10^4$ – 10^6 Гц, с помощью автоматизированной специализированной установки, использующей электрооптическую систему детекции клеток [5]. Для исследования использовали цельную кровь, разбавленную раствором сахарозы (0,3 М) в соотношении 1:30, рН = 7,3. Параметры: поляризуемость клеток, относительная поляризуемость, электропроводность,

обобщённые показатели вязкости, жёсткости клеток, амплитуда деформации эритроцитов, индексы агрегации, деструкции клеток, электрическая ёмкость эритроцитов, скорость движения клеток к электродам, дипольный момент, величина равновесной частоты оценивали на четырёх фиксированных частотах — $5 \cdot 10^4$ Гц, 10^5 Гц, $5 \cdot 10^5$ Гц и 10^6 Гц. Для компьютерной обработки данных использовали пакет оригинальных программ Cellfind.

Атомно-силовая микроскопия

Исследование формы эритроцитов, особенностей поверхности их мембраны проводилось методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) с помощью микроскопа «P47 SolverBio» фирмы «НТ-МДТ» (Зеленоград, Россия). Наблюдения проводились в полуконтактном режиме.

Терагерцовая спектроскопия

В работе использовался малогабаритный терагерцовый спектрометр с накачкой и регистрацией терагерцового излучения на второй гармонике (775 нм) фемтосекундного волоконного лазера. Спектральный диапазон спектрометра составлял 0,2–3,0 ТГц, спектральное разрешение 15 ГГц, динамический диапазон амплитуды терагерцового спектра — 400. Для измерения оптических свойств в терагерцовом диапазоне использовались взвеси эритроцитов в K^+ - Na^+ -фосфатном буфере. Толщина слоя взвеси эритроцитов во всех измерениях составляла 0,4 мм. Подробно устройство спектрометра и описание методики измерений приведены в работе [4].

Приготовление тонких плёнок из сыворотки крови и их эллипсометрическое исследование

Для получения тонких плёнок из сыворотки крови в настоящей работе использовали метод центрифугирования [14, 15]. Подробно получение и оценка качества плёнок описаны в работе [6]. Всем обследуемым были проведены эллипсометрические исследования сыворотки крови методами спектральной эллипсометрии. Эллипсометрические спектры $Y(l)$ и $D(l)$ записывали с помощью спектрального эллипсометрического комплекса «ЭЛЛИПС-1771», (ИФП СО РАН) [10] в диапазоне длин волн $l = 250$ – 1000 нм, спектральное разрешение прибора составляло 2 нм, время записи одного спектра не превышало 20 с, угол падения луча света на образец составлял 70° . Использовали четырёхзонную методику измерений с последующим усреднением по всем четырем зонам. Расчёт дисперсионных зависимостей показателя преломления $n(l)$ и значений толщин плёнок проводили решением обратной задачи эллипсометрии с использованием оптической модели: подложка — плёнка — среда. Оценивали следующие экспериментальные характеристики плёнок: значения эффективной толщины (d) и дисперсию показателя преломления $n(l)$ [3].

Спектроскопия комбинационного рассеяния света (Raman)

Спектры комбинационного рассеяния света жидких сывороток крови пациентов записывали с помощью спектрометра «Т64000» фирмы Horiba Jobin Yvon с тройным монохроматором при комнатной температуре. Для возбуждения использовали линию Ar^+ лазера с длиной

волны 514,5 нм, спектральное разрешение составляло $1,5 \text{ см}^{-1}$. В качестве детектора использовали кремниевую матрицу фотоприемников, охлаждаемую жидким азотом. Применяли приставку для микроскопических исследований комбинационного рассеяния света. Мощность лазерного пучка, доходящего до образца, составляла 2–3 мВт (размер пятна 5–6 мкм).

Статистическая обработка результатов измерений

Статистическая обработка данных выполнена с использованием программы SPSS, ver. 10. Достоверность различия показателей оценивали по критериям Стьюдента, Пирсона (при нормальном распределении), в случаях отклонения распределения от нормального использовались непараметрические критерии (U-критерий Манна–Уитни, Колмогорова–Смирнова).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Показатели морфометрии эритроцитов в группе сравнения имели следующее соотношение: дискоциты — 80–85%, деформированные — 5–10%, сфероциты — 10%. Для исходной картины морфологии крови у больных с циррозами было характерно понижение содержания нормальных двояковогнутых эритроцитов (дискоцитов) до 35–40% от общего числа эритроцитов; количество деформированных эритроцитов оказалось равным 20–25%, сфероцитов — 25–30%, асимметричных и двоямочных — 15% ($p < 0,001$). Отмечено набухание почти всех типов эритроцитов вследствие нарушения осмотического равновесия в крови. После воздействия неоднородного переменного электрического поля практически все эритроциты у больных с циррозами в течение 30 с необратимо переходили в форму сфероцитов. Столь выраженные морфологические изменения клеток красной крови при циррозах связаны с выраженными изменениями уровня, соотношения внутриклеточных фосфорорганических компонентов, макроэргических соединений [6]. Утяжеление класса ЦП предполагает нарастание тяжести печеночной энцефалопатии, при которой выявляется усиливающаяся гипераммониемия. Известно, что основное нейротоксическое действие аммиака заключается в снижении синтеза АТФ, стимуляции транспорта ароматических аминокислот в нейроны. С другой стороны, другие нейротоксины — меркаптаны, коротко- и среднецепочечные жирные кислоты приводят к торможению Na^+/K^+ -АТФазы в мембранах нервных клеток. Можно предположить подобные воздействия эндогенных нейротоксинов и на эритроциты, мембраны которых являются «зеркалом других клеточных мембран», в том числе нейроцитов [8]. При исследовании рельефа мембран эритроцитов методом атомно-силовой микроскопии отмечено, что у пациентов с циррозами на поверхности клеток наблюдаются два типа дефектов: поры, глубиной от 4 до 10 и более нм, и кратеры, которые характеризуются наличием границы в виде искаженной окружности и разной структурой поверхности внутри и вне кратера. С нарастанием тяжести ЦП количество и плот-

ность дефектов мембран эритроцитов достоверно повышалась ($p < 0,05$) (рис. 1).

Изучение электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов методом диэлектрофореза выявило, что по мере нарастания степени тяжести ЦП (от класса А к С по Чайлд–Пью) у обследуемых резко снижалась способность клеток к деформации с нарастанием обобщенных показателей вязкости и жесткости. При этом наиболее значимым для дискриминирования разных классов ЦП оказался обобщенный показатель вязкости (табл. 1). Экранирование поверхностного отрицательного заряда клеток повышенными уровнями крупномолекулярных белков, иммуноглобулинов вследствие выраженной диспротеинемии [6, 9] значительно снижало скорость движения клеток к электродам, их дипольный момент, способствовало образованию клеточных агрегатов крупных и гигантских размеров (из-за уменьшения сил электростатического отталкивания между клетками [8]). Токсическое раздражение красного ростка крови при ЦП [9] провоцирует активацию ускоренного малоэффективного эритропоэза с синтезом клеток с измененным структурным составом мембран, сниженной резистентностью, отражаемой низкими показателями поляризуемости на всех частотах. Такие эритроциты склонны к гемолизу при воздействии стрессовых факторов различной интенсивности, что усиливает образование смешанных клеточных агрегатов, приводит к повышению уровня непрямого билирубина. По мере утяжеления ЦП отмечено резкое снижение относительной поляризуемости, которая характеризует степень адаптации клетки к внешним условиям [5]. Резко сниженная биологическая активность клеток красной крови коррелировала с пониженными уровнями поляризуемости клеток на всех частотах ($p < 0,001-0,05$). По мере нарастания класса цирроза мембраны эритроцитов становились значительно утолщенными (что отражало достоверное сни-

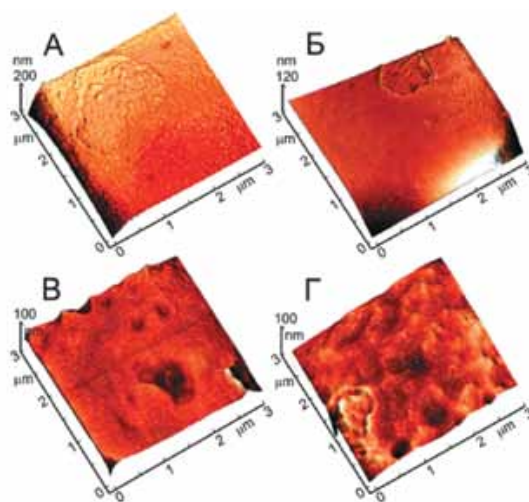


Рисунок 1. Атомно-силовая микроскопия мембран эритроцитов (мазки крови) в группах: А – группа сравнения; Б – пациенты с ЦП класса А; В – пациенты с ЦП класса В; Г – пациенты с ЦП класса С

жение уровня электрической ёмкости – $\rho < 0,001$), с высокой способностью проводить электрический ток. Показатель электропроводности продемонстрировал наличие значимых различий между отдельными классами ЦП. Утолщение мембран эритроцитов при ЦП в значительной степени связано с диспротеинемией. Получены прямые корреляции электрической ёмкости мембран эритроцитов с уровнем альбуминов ($r = 0,623, \rho < 0,0033$) и обратные с уровнем γ -глобулинов ($r = -0,514, \rho < 0,004$). Кроме того, высокий уровень фибриногена также увеличивает толщину мембран эритроцитов, адсорбируясь на них, снижая отрицательный поверхностный заряд клеток посредством его экранирования ($r = -0,487, \rho < 0,002$). Отмечено достоверное смещение равновесной частоты в высокочастотный диапазон с утяжелением цирроза, что отражает нарастание степени интоксикации [6] ($\rho < 0,001-0,05$) (табл. 1). Таким образом, анализ электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов выявил ряд характеристик, которые достоверно различались не только в крайних случаях (компенсированный – декомпенсированный цирроз), но и в промежуточную стадию (класс В по Чайлд-Пью). Это обобщённый показатель вязкости, относительная поляризуемость, электропроводность, ёмкость клеточной мембраны, положение равновесной частоты. Эти параметры наиболее значимы в дискриминировании классов ЦП.

Исследование взвесей эритроцитов методом терагерцовой спектроскопии выявило нарастающее снижение уровней амплитудного пропускания излучения, пропускания по мощности на всех частотах диапазона у пациентов с ЦП по мере нарастания декомпенсации. Причём наиболее значимые различие, связанные с классами ЦП, отмечены в частотном диапазоне от 0,5 до 4,1 ТГц ($\rho < 0,001-0,02$) (рис. 2). Выявлены корреляции интенсивности амплитудного пропускания с индексами агрегации и деструкции ($r = 0,70, \rho < 0,01, r = 0,63, \rho < 0,03$ соответ-

ственно), уровнем предгемолитических форм эритроцитов ($r = 0,60, \rho < 0,05$), сниженным дипольным моментом клеток ($r = -0,68, \rho < 0,04$), амплитудой деформации эритроцитов ($r = -0,66, \rho < 0,015$), ёмкостью мембран клеток ($r = 0,57, \rho < 0,04$). Сила связи и степень достоверности выявленных связей возрастали с усилением декомпенсации ЦП. Исследование эллипсометрических показателей тонких плёнок, полученных из сывороток крови пациентов с разными классами ЦП, выявило увеличение показателя преломления в сочетании со снижением толщины плёнки (рис. 3), усилением её неоднородности, увеличением количества и глубины трещин, разрывов в структуре тонкой плёнки по мере нарастания декомпенсации цирроза ($\rho < 0,001-0,05$) (рис. 4). Подобные изменения могут быть связаны со снижением синтеза целого ряда соединений в печени (в том числе белков сыворотки крови — из них альбумина, факторов свёртывания, холестерина, триглицеридов и др.) при декомпенсации ЦП [6, 9], которые являются определяющими для толщины плёнки [3] (корреляции для уровней общего холестерина $r = 0,67, \rho < 0,04$; триглицеридов $r = 0,50, \rho < 0,05$; общего белка $r = 0,67, \rho < 0,02$; альбумина $r = 0,70, \rho < 0,01$; протромбина $r = 0,65, \rho < 0,03$). Из приведённых показателей уровни альбумина, протромбиновое время значимы для определения класса ЦП.

Прогрессирующая неравномерность плёнок по мере нарастания декомпенсации цирроза, очевидно, связана с выраженностью биохимического дисбаланса в сыворотке крови. Показатель преломления определялся в большей степени компонентами синдромов цитолиза (для АЛТ $r = 0,66, \rho < 0,02$, для АСТ $r = 0,48, \rho < 0,04$) и холестаза (для общего билирубина $r = 0,68, \rho < 0,01$, для ГГТП $r = 0,54, \rho < 0,03$), степень выраженности которых усиливается по мере нарастания степени тяжести ЦП [9]. Следует также иметь в виду нарастание аминокислотного дисбаланса по мере декомпенсации ЦП, которое ска-

Таблица 1. Вязкоупругие и электрические параметры эритроцитов у больных с ЦП различной степени тяжести и в группе сравнения ($M \pm m$)

Показатели эритроцитов	1-я группа сравнения, n = 33	2-я группа ЦП класса А, n = 12	3-я группа ЦП класса В, n = 25	4-я группа ЦП класса С, n = 9
Амплитуда деформации (м)	$(2,74 \pm 0,51) \cdot 10^{-6}$	$(0,54 \pm 0,05) \cdot 10^{-6}***$	$(0,47 \pm 0,08) \cdot 10^{-6}***$	$(0,40 \pm 0,06) \cdot 10^{-6}***$
Обобщённый показатель жёсткости (Н/м)	$(3,88 \pm 0,5) \cdot 10^{-6}$	$(9,3 \pm 0,9) \cdot 10^{-6}***$	$(12,8 \pm 1,0) \cdot 10^{-6}****$	$(13,7 \pm 0,8) \cdot 10^{-6}****$
Обобщённый показатель вязкости (Па.с)	$0,34 \pm 0,05$	$0,76 \pm 0,04***$	$0,85 \pm 0,05***$	$0,98 \pm 0,04****\$$
Индекс агрегации Eg (усл. ед.)	$0,52 \pm 0,04$	$0,72 \pm 0,05***$	$0,80 \pm 0,03***$	$0,86 \pm 0,04****$
Индекс деструкции Eg (%)	$0,9 \pm 0,3$	$7,5 \pm 0,3***$	$8,4 \pm 0,7***$	$9,7 \pm 0,6****$
Поляризуемость (m^3) (частота 10^6 Гц)	$(9,5 \pm 0,4) \cdot 10^{-15}$	$(5,1 \pm 0,5) \cdot 10^{-15}***$	$(4,4 \pm 0,2) \cdot 10^{-15}***$	$(3,9 \pm 0,3) \cdot 10^{-15}****$
Относительная поляризуемость (b/ρ)	$0,81 \pm 0,09$	$0,44 \pm 0,08***$	$0,23 \pm 0,05****$	$0,12 \pm 0,03****\$$
Электропроводность (см/м)	$(2,6 \pm 0,4) \cdot 10^{-5}$	$(7,5 \pm 0,4) \cdot 10^{-5}***$	$(8,6 \pm 0,4) \cdot 10^{-5}****$	$(9,5 \pm 0,3) \cdot 10^{-5}****\$$
Ёмкость клеточной мембраны (Ф)	$(7,4 \pm 0,4) \cdot 10^{-14}$	$(4,6 \pm 0,3) \cdot 10^{-14}***$	$(3,3 \pm 0,4) \cdot 10^{-14}****$	$(2,5 \pm 0,2) \cdot 10^{-14}****\$$
Скорость движения Eg к электродам (мкм/с)	$11,0 \pm 1,7$	$6,1 \pm 1,5^*$	$4,9 \pm 1,2^{**}$	$3,9 \pm 1,3^{***}$
Положение равновесной частоты (Гц)	$(4,8 \pm 0,4) \cdot 10^5$	$(7,7 \pm 0,5) \cdot 10^5***$	$(8,9 \pm 0,4) \cdot 10^5****$	$(9,9 \pm 0,3) \cdot 10^5****\$$
Дипольный момент (Кл.м)	$(14,8 \pm 2,1) \cdot 10^{-22}$	$(5,1 \pm 1,7) \cdot 10^{-22}***$	$(4,0 \pm 1,1) \cdot 10^{-22}****$	$(3,2 \pm 1,2) \cdot 10^{-22}****\$$

Примечание 1. М — среднее, m — средняя ошибка, * — статистическая значимость отличия от 1 группы (* — $\rho < 0,05$, ** — $\rho < 0,01$, *** — $\rho < 0,0001$); ^ — статистическая значимость отличия от 2-й группы (^ — $\rho < 0,05$, ^^ — $\rho < 0,02$, ^^^ — $\rho < 0,0001$); \$ — статистическая значимость отличия от 3-й группы (\$ — $\rho < 0,05$, \$\$ — $\rho < 0,02$, \$\$\$ — $\rho < 0,0001$).
 Примечание 2. Величина дипольного момента рассчитывалась при напряжённости электрического поля $8,85 \cdot 10^{12}$ Ф/м.

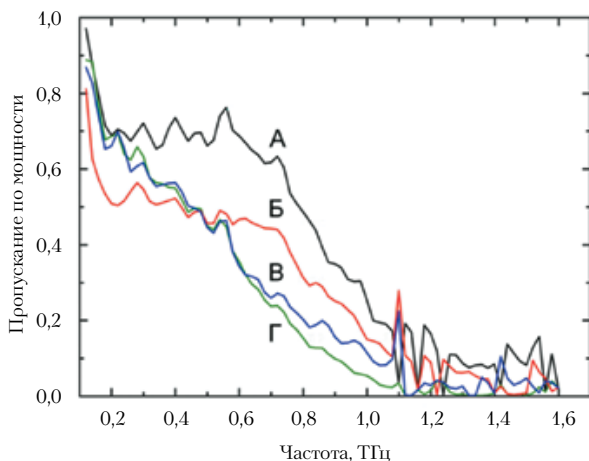
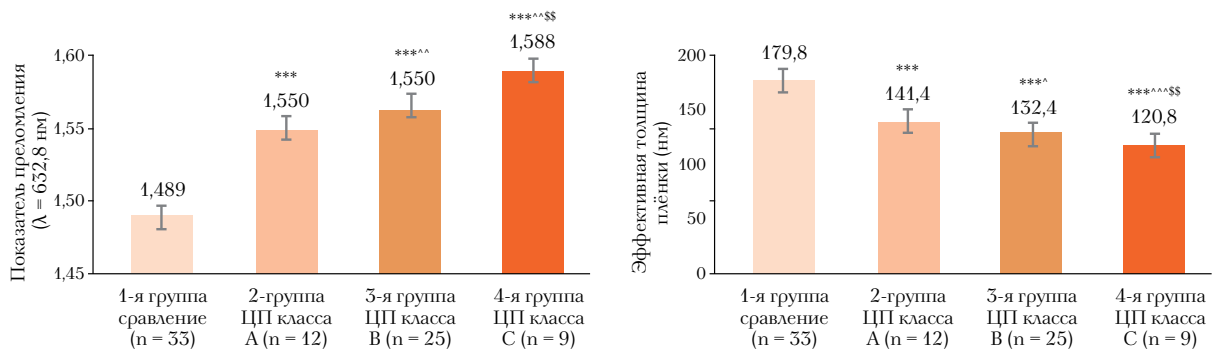


Рисунок 2. Зависимость пропускания по мощности терагерцового излучения от частоты взвесами эритроцитов обследуемых: А – группа сравнения; В – пациенты с ЦП класса А; В – пациенты с ЦП класса В; Г – пациенты с ЦП класса С

зывается на параметрах тонких плёнок [14]. Он характеризуется увеличением содержания в крови ароматических аминокислот и снижением уровня аминокислот с разветвлённой боковой цепью. Это соотношение аминокислот отражает коэффициент Фишера, который характеризует стадии печёночной энцефалопатии. С другой стороны, значимый показатель, характеризующий класс ЦП, — асцит в числе звеньев патогенеза имеет нарушение катаболизма гормонов и других биологически активных веществ в печени, что обуславливает повышение сывороточных концентраций ренина, альдостерона, ангиотензина, вазопрессина, приводящее к задержке натрия и воды [6]. Наблюдаемые сдвиги в количественном и качественном составе сыворотки крови с нарастанием степени декомпенсации ЦП сказываются на оптических параметрах тонких плёнок [3, 4], что и выявлено в нашей работе. В спектрах комбинационного рассеяния света образцов жидких сывороток крови в области 750–1750 см⁻¹ основные различия между группами от-

мечены по интенсивности трёх пиков поглощения: при 1005, 1157 и 1520 см⁻¹. Они достоверно снижались по мере нарастания степени тяжести ЦП ($p < 0,005-0,02$) (табл. 2). Наиболее значимые различия по интенсивности пиков выявлены в крайних группах (класс цирроза А и С). Вероятно, это связано с нарастающим снижением белоксинтетической функции печени по мере декомпенсации ЦП [6, 9]. Дело в том, что площади пиков при 1157 см⁻¹, 1520 см⁻¹ оказались связанными с показателями, отражающими белоксинтетическую функцию печени: уровнем альбуминов ($r = -0,76, p < 0,01$ для пика при 1157 см⁻¹; $r = -0,67, p < 0,04$ для пика при 1520 см⁻¹), протромбина, антитромбина III и протеина С ($r = -0,82, p < 0,03$; $r = -0,72, p < 0,04$; $r = -0,65, p < 0,01$ соответственно для пика при 1520 см⁻¹). Полученные результаты согласуются с данными L.N. Rodia-Osornio и соавт. [13], С. Camerlingo и соавт. [12], которые установили зависимость интенсивности пиков при 1157, 1520 см⁻¹ от количества С-С связей, выраженности деформационных колебаний С-ОН, уровней amid I молекул протеинов.

Выявлены корреляции эллипсомерических показателей с интенсивностью пиков Раман-спектров: показателя преломления с площадью пиков при 1157, 1520 см⁻¹ ($r = -0,71, p < 0,03$; $r = -0,63, p < 0,04$ соответственно); толщины плёнки с интенсивностью тех же пиков ($r = 0,68, p < 0,005$ для пика при 1157 см⁻¹; $r = 0,70, p < 0,02$ для пика при 1520 см⁻¹). С неоднородностью плёнок коррелировало отклонение пика при 1520 см⁻¹ ($r = 0,66, p < 0,05$). Обнаружены связи ряда электрических и вязкоупругих показателей эритроцитов с интенсивностями пиков Раман-спектров. Так, амплитуда деформации клеток оказалась обратно связанной с интенсивностью пика при 1005 см⁻¹ ($r = -0,70, p < 0,02$), а обобщённая жёсткость эритроцитов продемонстрировала с ней прямую связь ($r = 0,62, p < 0,03$). Обобщённая вязкость коррелировала с интенсивностями пиков при 1001 см⁻¹ ($r = 0,81, p < 0,04$). Уровень гемолиза на высоких и низких частотах оказался связан с интенсивностью пика 1520 см⁻¹ ($r = -0,72, p < 0,04$ для 1 МГц; $r = 0,62, p < 0,03$ для 0,5 МГц; $r = -0,52, p < 0,05$ для 0,1 МГц; $r = -0,58, p < 0,02$ для 0,05 МГц).



Примечание: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,0001$ — статистическая значимость отличия от 1-й группы; * — статистическая значимость отличия от 2-й группы (* – $p < 0,05$, ** – $p < 0,02$, *** – $p < 0,0001$); \$ — статистическая значимость отличия от 3-й группы (\$ — $p < 0,05$, \$\$ — $p < 0,02$).

Рисунок 3. Величины эффективной толщины и показателя преломления плёнок, приготовленных из сывороток крови обследуемых, в группах

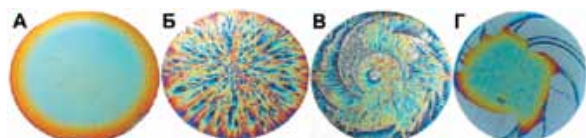


Рисунок 4. Внешний вид типичных плёнок, полученных из сывороток крови обследуемых, в группах: А – группа сравнения; Б – пациенты с ЦП класса А; В – пациенты с ЦП класса В; Г – пациенты с ЦП класса С

Таблица 2. Площадь пиков комбинационного рассеяния света у больных с ЦП различных классов и в группе сравнения ($M \pm m$)

Положение пика, см ⁻¹	1-я группа сравнения (n = 33)	2-я группа ЦП класса А (n = 12)	3-я группа ЦП класса В (n = 25)	4-я группа ЦП класса С (n = 9)
1005	902 ± 110	510 ± 89**	428 ± 62***	320 ± 54****
1157	2641 ± 228	852 ± 115***	602 ± 90****	551 ± 94****
1520	3008 ± 127	812 ± 100****	623 ± 74****	504 ± 60****

Примечание: М — среднее, m — средняя ошибка, достоверность различий по группам, как в табл. 1.

Выводы

1. По мере нарастания класса ЦП увеличивается уровень деформированных форм клеток с изменённым рельефом мембран со снижением мощности пропускания терагерцового излучения взвесью эритроцитов.

2. Из вязкоупругих и электрических параметров эритроцитов обобщённый показатель вязкости, относительная поляризуемость, электропроводность, ёмкость клеточной мембраны, положение равновесной частоты оказались наиболее значимы для определения степени тяжести ЦП.

3. Нарастание декомпенсации ЦП приводит к снижению толщины тонких плёнок, полученных из сыворотки крови, с повышением их показателя преломления, гетерогенности структуры. При этом отмечено достоверное снижение площадей пиков поглощения Raman-спектров при 1005, 1157 и 1520 см⁻¹.

Таким образом, полученные результаты демонстрируют возможности оптических методов исследования крови, её отдельных компонентов в диагностике степени тяжести ЦП. Они позволили выявить комплекс наиболее значимых оптических показателей для дискриминирования класса ЦП. Возможно, продолжение исследований в данном направлении позволит выявлять ранние «оптические» признаки декомпенсации ЦП.

Ⓐ

Список литературы

1. Анцыгин В.Д., Мамрашев А.А., Николаев Н.А., Потатуркин О.И. Малогабаритный терагерцовый спектрометр с использованием второй гармоники фемтосекундного волоконного лазера // Автометрия. 2010. Т. 46. № 3. С. 110–117.

2. Воевода М.И., Кручинина М.В., Курилович С.А., Кручинин В.Н., Рыхлицкий С.В., Володин В.А., Пельтек С.Е., Кобзев В.Ф., Князев Б.А., Герасимов В.В. Диффузная патология печени: что нового в диагностике степени фиброза? // Материалы VIII Международной научно-практической конференции «Aktualne problemy nowoczesnych nauk – 2012». Vol. 37. Medycyna: Przemysl. Nauka i studia. 2012. С. 7–11.

3. Воевода М.И., Пельтек С.Е., Кручинина М.В., Курилович С.А., Кручинин В.Н., Могильников К.П., Рыхлицкий С.В. Исследование тонких плёнок, полученных центрифугированием сыворотки крови человека, методами спектральной эллипсометрии и ИК-спектроскопии // Автометрия. 2010. Т. 46. № 4. С. 106–120.

4. Воевода М.И., Кручинина М.В., Пельтек С.Е., Курилович С.А., Кручинин В.Н., Спасивцев Е.В., Рыхлицкий С.В., Володин В.А., Генералов В.М., Герасимов В.В., Князев Б.А. Использование оптических методов исследования крови в диагностике стадии заболевания при диффузной патологии печени // Архив внутренней медицины. 2012. № 4. С. 46–54.

5. Генералов В.М., Кручинина М.В., Дурыманов 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.

6. Ивашкин В.Т. Болезни печени и желчевыводящих путей. Руководство для врачей. Москва, М.: Вести. 2002. 387 с.

7. Курилович С.А., Кручинина М.В., Генералов В.М., Бакиров Т.С., Рихтер В.А., Семенов Д.В. Электрические параметры и структура мембран эритроцитов при диффузных заболеваниях печени. // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2009. Т. XIX. № 2. С. 30–36.

8. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А. Физиология и патофизиология эритроцита / Томск: Издательство ТГУ, 2004. 202 с.

9. Подымова С.Д. Болезни печени. М.: Медицина. 1993. 544 с.

10. Рыхлицкий С.В., Спасивцев Е.В., Швец В.А., Прокопьев В.Ю. Спектральный эллипсометрический комплекс «ЭЛЛИПС-1771» // Приборы и техника эксперимента. 2007. № 2. С. 160–161.

11. Arwin H. Ellipsometry on thin organic layers of biological interest: characterization and applications // Thin Solid Films. 2000. V. 377–378. P. 48–56.

12. Camerlingo C., Zenone F., Perna G. et al. An investigation on micro-Raman spectra and wavelet data analysis for pemphigus vulgaris follow-up monitoring // Sensors. 2008. V. 8. P. 3656–3664.

13. Rocha-Osornio L.N., Pichardo-Molina J.L., Barbosa-Garcia O. et al. Chemo-metric techniques on the analysis of Raman spectra of serum blood samples of breast cancer patients // Proc. of SPIE. 2008. V. 6864. P. 16 (1–7).

14. Dimitriev Y., Ivanova Y., Iordanova R. History of sol-gel science and technology (review) // Journal of the University of Chemical technology and Metallurgy. 2008. V. 43. № 2. P. 181–192.

15. Vorotilov K., Petrovsky V., Vasiljev V. Spin coating process of sol-gel silicate films deposition: effect of spin speed and processing temperature // Journal of Sol-Gel Science and Technology. 1995. V. 5. P. 173–183.

Исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, соглашение 8041 от 24.08.2012, номер заявки «2012-11-12-000-1001-004»; при частичной финансовой поддержке Минобрнауки РФ (ГК № 02740.11.0556), гранта РФФИ 11-02-12171-офи-м при использовании оборудования ЦКП СЦСТИ в рамках ГК № 16.552.117044 и при использовании оборудования научно-образовательного комплекса НГУ «Наносистемы и современные материалы»; гранта в рамках программы фундаментальных исследований Президиума РАН № 24 «Фундаментальные основы технологий наноструктур и наноматериалов».