

Особенности жирнокислотного профиля мембран эритроцитов у пациентов с жировой болезнью печени алкогольного генеза

М.В. Кручинина^{1,2}, <https://orcid.org/0000-0003-0077-3823>, kruchmargo@yandex.ru

М.В. Паруликова¹, m_parulikova@mail.ru

А.В. Белковец^{1,2}, <https://orcid.org/0000-0002-2610-1323>, a_belkovets@bk.ru

К.Ю. Николаев¹, <https://orcid.org/0000-0003-4601-6203>, nikolaevky@yandex.ru

А.К. Овсянникова¹, <https://orcid.org/0000-0002-9669-745X>, aknikolaeva@bk.ru

¹ Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук; 630089, Россия, Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, д. 175/1

² Новосибирский государственный медицинский университет; 630091, Россия, Новосибирск, Красный проспект, д. 52

Резюме

Введение. Алкогольный стеатоз, будучи обратимым состоянием, в настоящее время рассматривается как значительный фактор риска прогрессирования диффузной патологии печени, поэтому значимо понимание его молекулярных механизмов.

Цель. Изучить особенности жирнокислотного профиля мембран эритроцитов у пациентов с жировой болезнью печени алкогольного генеза для возможного использования жирных кислот (ЖК) как биомаркеров и потенциальных терапевтических таргетов.

Материалы и методы. Обследован 31 мужчина с алкогольной жировой болезнью печени (АЖБП) (средний возраст $45,1 \pm 17,1$ года) и 28 мужчин сопоставимого возраста без АЖБП и манифестирующей патологии внутренних органов. Исследование состава и уровней ЖК мембран эритроцитов (Эр) проведено с помощью газовой хроматографии/масс-спектрометрии – системы на основе трех квадрупольной *Agilent 7000B* (США).

Результаты и обсуждение. Установлено более высокое содержание ряда насыщенных ЖК (лауриновой, маргариновой, пентадекановой), мононенасыщенных ЖК (МНЖК), являющихся дополнительными факторами прогрессирования АЖБП (пальмитолеиновой, суммарного уровня мононенасыщенных), соотношения n-6/n-3 полиненасыщенных ЖК (ПНЖК), альфа-линоленовой ЖК у пациентов с АЖБП по сравнению с группой контроля ($p = 0,00002-0,05$). Напротив, концентрации арахидиновой, докозагексаеновой, суммарное содержание эйкозапентаеновой и докозагексаеновой n-3 ПНЖК, суммарный уровень всех n-3 ПНЖК оказались ниже у больных АЖБП, чем у здоровых мужчин ($p = 0,003-0,01$), что ассоциировано с усилением этанол-индуцированного липолиза жировой ткани через ось PDE3B-AMPK. Использование «панели» ЖК (C16:1;9, сумма МНЖК, n-6/n-3 ПНЖК, C22:6n3, C20:0) обеспечило высокие уровни чувствительности (79%), специфичности (81%) (AUC 0,808) при различении пациентов с АЖБП от здоровых. Выявлены разнонаправленные ассоциации уровней ЖК мембран эритроцитов между собой и с показателями печеночных проб, липидного профиля.

Заключение. Таким образом, выявлены особенности ЖК мембран эритроцитов у пациентов с АЖБП и возможности их использования как биомаркеров для дифференцирования от здоровых лиц.

Ключевые слова: алкогольная жировая болезнь печени, жирные кислоты, мембраны эритроцитов, газовая хроматография, масс-спектрометрия, биомаркеры

Благодарности. Работа выполнена по Государственному заданию в рамках бюджетных тем FWNR-2022-0024, FWNR-2023-0003. Авторы выражают глубокую благодарность А.С. Соколовой, к.х.н., научному сотруднику лаборатории физиологически активных веществ ФГБУН «Новосибирский институт органической химии имени Н.Н. Ворожцова СО РАН» за помощь в подготовке образцов для проведения исследования жирных кислот эритроцитов; М.В. Шашкову, к.х.н., научному сотруднику аналитической лаборатории ФГБУН «Институт катализа имени Г.К. Борескова СО РАН» за исследование уровня жирных кислот.

Для цитирования: Кручинина МВ, Паруликова МВ, Белковец АВ, Николаев КЮ, Овсянникова АК. Особенности жирнокислотного профиля мембран эритроцитов у пациентов с жировой болезнью печени алкогольного генеза. *Медицинский совет.* 2023;17(18):84–96. <https://doi.org/10.21518/ms2023-391>.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Features of the fatty acid profile of erythrocyte membranes in patients with fatty liver disease of alcoholic genesis

Margarita V. Kruchinina^{1,2}, <https://orcid.org/0000-0003-0077-3823>, kruchmargo@yandex.ru

Marina V. Parulikova¹, m_parulikova@mail.ru

Anna V. Belkovets^{1,2}, <https://orcid.org/0000-0002-2610-1323>, a_belkovets@bk.ru

Konstantin Yu. Nikolaev¹, <https://orcid.org/0000-0003-4601-6203>, nikolaevky@yandex.ru

Alla K. Ovsyannikova¹, <https://orcid.org/0000-0002-9669-745X>, aknikolaeva@bk.ru

¹ Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; 175/1, Boris Bogatkov St., Novosibirsk, 630089, Russia

² Novosibirsk State Medical University; 52, Krasny Ave., Novosibirsk, 630091, Russia

Abstract

Introduction. Alcoholic steatosis, which is a reversible condition, is currently considered a significant risk factor for the progression of diffuse liver pathology, therefore understanding of its mechanisms at the molecular level is essential.

Aim. To study the features of the fatty acid profile of erythrocyte membranes in patients with fatty liver disease of alcoholic origin for possible use of fatty acids (FAs) as biomarkers and potential therapeutic targets.

Materials and methods. A total of 31 men with alcoholic fatty liver disease (AFLD) (average age of 45.1 ± 17.1 years) and 28 men of comparable age without AFLD and symptomatic pathology of internal organs were examined. The FA composition and levels of erythrocyte membranes (ER) were studied using Agilent 7000B (USA) triple quadrupole gas chromatography/mass spectrometry.

Results and discussion. A higher level of a range of saturated FAs (lauric, margaric, pentadecane), monounsaturated FAs (MUFAs), which are additional factors for the progression of AFLD (palmitoleic, total monounsaturated acids), n-6/n-3 polyunsaturated FAs ratio (PUFAs), alpha-linolenic FA was detected in patients with AFLD vs the control group ($p = 0.00002-0.05$). In contrast, the levels of arachidic and docosahexaenoic acids, total eicosapentaenoic and docosahexaenoic n-3 PUFAs, and total n-3 PUFAs were lower in patients with AFLD than in healthy men ($p = 0.003-0.01$), which is associated with increased ethanol induced adipose tissue lipolysis via PDE3B-AMPK axis. The use of FAs panel (C16:1;9, sum MUFA, n-6/n-3 PUFA, C22:6n3, C20:0) to distinguish patients with AFLD from healthy ones ensured high levels of sensitivity (79%), and specificity (81%) (AUC 0.808). Multidirectional associations of FA levels in erythrocyte membranes with each other and liver tests and lipid profile results were revealed.

Conclusion. Thus, the features of erythrocytes membrane FAs in patients with AFLD and the potential to use them as biomarkers for differentiation of people with AFLD from healthy individuals have been identified.

Keywords: alcoholic fatty liver disease, fatty acids, red blood cells membranes, gas chromatography, mass spectrometry, biomarkers

Acknowledgments. This work was carried out as part of the state assignment within the budgetary themes FWNR-2022-0024, FWNR-2023-0003. The authors wish to express their deepest gratitude to A.S. Sokolova, Cand. Sci. (Chem.), Research Associate of the Laboratory of Physiologically Active Compounds (LPhAC), N.N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences for assistance with sample preparation for erythrocyte fatty acids testing; M.V. Shashkov, Cand. Sci. (Chem.), Research Associate of the analytical laboratory, G.K. Boreskov Institute of Catalysis of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences for testing the levels of fatty acids.

For citation: Kruchinina MV, Parulikova MV, Belkovets AV, Nikolaev KYu, Ovsyannikova AK. Features of the fatty acid profile of erythrocyte membranes in patients with fatty liver disease of alcoholic genesis. *Meditsinskiy Sovet.* 2023;17(18):84–96. (In Russ.) <https://doi.org/10.21518/ms2023-391>.

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

ВВЕДЕНИЕ

Злоупотребление алкоголем и хроническое потребление этанола остаются серьезной проблемой общественного здравоохранения и являются причиной высокого уровня заболеваемости [1]. Вызванное алкоголем ожирение печени обычно начинается как стеатоз и, если причина сохраняется, неизменно прогрессирует до стеатогепатита и цирроза [2]. Многочисленные клинические исследования и исследования на животных продемонстрировали, что алкогольный стеатоз печени сопровождается увеличением жировой массы [3] и поглощения жирных кислот гепатоцитами [4]. Считалось, что стеатоз печени, характеризующийся накоплением липидов в цитоплазме гепатоцитов, является самой ранней реакцией на употребление алкоголя и обратимым патологическим состоянием [2]. Таким образом, уменьшение вызванного алкоголем накопления жира в печени может блокировать или задерживать прогрессирование стеатоза до более поздних стадий алкогольной болезни печени.

Исследования Yue Jia et al. в 2019 г. продемонстрировали более высокий потенциал прогрессирования в аденокарциному алкогольной жировой болезни печени по сравнению с неалкогольной [5]. Ряд авторов

продемонстрировал большие темпы прогрессирования фиброза печени в случаях алкогольного генеза заболевания [6], что может быть установлено неинвазивными методами, включая непрямую эластометрию.

Первоначальное биохимическое объяснение развития алкогольной жировой дистрофии печени основывалось на способности этанола изменять окислительно-восстановительное состояние печени и ингибировать окисление жирных кислот. Последующие исследования показали подавление окисления жирных кислот в митохондриях печеночных клеток и индукцию липогенеза при систематическом потреблении алкоголя [7]. Этанол активирует стерольный регуляторный элемент, связывающий белок 1, индуцируя ряд липогенных ферментов. Эти эффекты могут быть частично обусловлены ингибированием АМФ-зависимой протеинкиназы, снижением уровня адипонектина в плазме крови или повышением уровня ФНО- α в печени. Данные факторы, в свою очередь, активируют липогенные пути и ингибируют окисление жирных кислот (ЖК). Помимо синтеза и окисления жирных кислот этанол также изменяет метаболизм липидных капель (форма хранения триглицеридов) в гепатоцитах и секрецию липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП) печенью [7]. Поскольку алкогольный стеатоз

в настоящее время рассматривается как значительный фактор риска прогрессирования диффузной патологии печени, понимание его молекулярных механизмов, включая липидомический профиль, открывает новые терапевтические мишени для устранения алкогольной жировой дистрофии печени.

Цель – изучить особенности жирнокислотного профиля мембран эритроцитов у пациентов с жировой болезнью печени алкогольного генеза для возможного использования жирных кислот как биомаркеров и потенциальных терапевтических таргетов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн исследования – сравнительное нерандомизированное открытое исследование «серия случаев». Обследован 31 мужчина с алкогольной жировой болезнью печени (АЖБП) (средний возраст $45,1 \pm 17,1$ года), выявленной при выполнении УЗИ органов брюшной полости. Алкогольный генез стеатоза устанавливался по данным достоверно подтвержденного наличия систематического потребления алкоголя в настоящее время и в анамнезе (по данным стандартного опроса, в том числе с помощью CAGE-опросника, AUDIT). Большая часть обследованных регулярно потребляла алкоголь (более 3 раз в неделю) в течение от 8 до 22 лет, разовая доза потребляемого алкоголя составила $120,73 \pm 78,7$ г, недельная – $641,87 \pm 466,9$ г. В момент исследования крови пациенты находились в состоянии абстиненции (в среднем $4,96 \pm 3,3$ дня), причем доза алкоголя, выпитого накануне, составила $125,32 \pm 87,5$ г в пересчете на чистый этанол. 87% (27 человек) пациентов указали на предпочтение крепких алкогольных напитков (водка, коньяк, виски), остальные потребляли алкогольные напитки различной крепости.

У пациентов отсутствовали проявления метаболического синдрома [8]. Вирусная этиология заболевания исключена на основании отсутствия серологических маркеров, выявляемых методом иммуноферментного анализа, и/или ДНК и РНК вирусов, обнаруживаемых методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). У пациентов были исключены генетически детерминированные заболевания, ассоциированные с жировой болезнью печени (ЖБП): болезнь Вильсона – Коновалова (исследован уровень церулоплазмينا крови), врожденная недостаточность альфа1-антитрипсина (выявление 2 мутаций гена *SERPINA1* – G264V и G342L), гемахроматоз (наличие мутаций в гене *HFE* (в локусах 187 C>G (H63D) и 845 G>A (C282Y)). Определение антител ANA, SMA и AT-LKM-1 позволило исключить аутоиммунный гепатит. Лекарственный анамнез и отмена возможного препарата, формирующего липопротеины промежуточной плотности, обеспечили исключение лекарственного гепатита. У пациентов не было длительного (более 2 нед.) парентерального питания как возможной причины развития ЖБП.

В качестве группы сравнения отобраны мужчины, проходившие профилактическое обследование, – 28 человек (средний возраст $47,3 \pm 14,3$ года), ведущих здоровый

образ жизни, употребляющих алкоголь не чаще 1–2 раз в месяц в дозах, не превышающих 20 г в сутки в пересчете на чистый этанол, без манифестирующей патологии внутренних органов и проявлений метаболического синдрома.

Пациенты с АЖБП и мужчины группы сравнения исключались из исследования, если они получали какие-либо добавки омега-3 полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) или статины, имели гиперлипидемию, которая могла потребовать лекарственной коррекции, значительные отклонения по данным исследования общего анализа крови или биохимии крови или имели холестериновые камни в желчном пузыре, поскольку эти факторы оказывают существенное влияние на профиль ЖК мембран эритроцитов [9].

У всех обследованных методом непрямого эластометрии на аппарате FibroScan® 502 (Echosens, Франция) определена степень выраженности фиброза печени с разграничением стадии фиброза по шкале METAVIR от F0 до F4 [10]. У пациентов с АЖБП она не превышала I степени, в группе сравнения соответствовала F0.

Исследование состава и уровней ЖК мембран эритроцитов (Эр) проведено с помощью газовой хроматографии / масс-спектрометрии – системы на основе трех квадрупольной *Agilent 7000B* (США). Концентрации ЖК выражали в относительных процентах. Предел обнаружения ЖК ~ 1 мкг на образец. Подробное описание пробоподготовки для исследования ЖК и процесса их определения представлено в работе М.В. Кручининой и соавт. [11]. Кроме содержания отдельных ЖК определяли суммарное содержание насыщенных, ненасыщенных, полиненасыщенных, омега-3 ПНЖК, омега-6 ПНЖК, их соотношения.

Статистическая обработка данных

При выполнении статистической обработки данных определялся характер распределения количественных признаков методом Колмогорова – Смирнова. В случае нормального распределения вычислялось среднее значение (M) и среднеквадратическое отклонение (SD) ($M \pm SD$). При сравнении двух нормально распределенных выборок использовался t-тест Стьюдента. При отсутствии нормального распределения вычислялась медиана (Me) и 25 и 75 перцентили [25%; 75%], достоверность различия показателей оценивали с помощью непараметрических критериев (U-критерий Манна – Уитни, критерий Краскела – Уоллиса, критерий χ^2). Содержание ЖК мембран Эр перед проведением статистической обработки было подвергнуто процедуре нормализации. Для выявления значимых различий в уровнях метаболитов между группами и их ранжирования были использованы методы Volcano plot, дискриминантный анализ (метод наименьших квадратов). Оценка диагностической точности различия пациентов с АЖБП от мужчин группы сравнения с использованием уровня ЖК мембран Эр произведена с помощью ROC-анализа. Ранговые коэффициенты корреляции Спирмена использовались для оценки корреляций между дискретными переменными. При выполнении статистической обработки материала применена система методов машинного обучения (RandomForest)

с использованием программного обеспечения MATLAB (R2019a, MathWorks) и языка программирования R с применением стандартных библиотек обучающих классификаций и наборов инструментов статистики [12]. Во всех процедурах статистического анализа критический уровень значимости нулевой гипотезы (p) принимался равным 0,05.

Исследование одобрено Этическим комитетом ФГБНУ «НИИ терапии и профилактической медицины» (протокол заседания № 122 от 29.11.2016). Все обследованные дали информированное согласие на участие в работе в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 № 266.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Клинико-биохимическая характеристика обследованных групп представлена в *табл. 1*. Пациенты обеих групп были сопоставимы по возрасту, антропометрическим показателям, ряду биохимических параметров (уровням глюкозы натощак, общего белка, альбумина, мочевины). Активность большей части печеночных ферментов (трансаминаз, ГТТП, щелочной фосфатазы), содержание общего билирубина и его прямой фракции, железа сыворотки крови, отражающих повреждение печени, у пациентов с АЖБП оказались выше, чем в группе сравнения ($p = 0,028 - 0,000001$), находясь в пределах референтных значений или с минимальными отклонениями от них. Данный факт не исключает наличия активного воспаления в печени, т.е. стеатогепатита [13]. Содержание общего белка и альбумина у пациентов с АЖБП было сопоставимо со значениями у мужчин группы сравнения, что свидетельствует о сохранности белково-синтетической функции печени. У пациентов с алкогольным генезом ЖБП плотность печени оказалась достоверно выше, чем в контроле ($p = 0,028$), подтверждая высокий потенциал этанола как фактора фиброгенеза [14].

Пациентам обеих групп проведено определение относительного уровня ЖК мембран Эр, после чего полученные значения подверглись нормализации (*рис. 1*). Для выявления различий в нормализованных уровнях ЖК у пациентов с АЖБП и здоровых обследуемых был выполнен дискриминантный анализ методом наименьших квадратов (ortho PLS-DA), который продемонстрировал наличие перечня ЖК мембран Эр, по уровню которых группы достоверно различаются (*рис. 2*).

Метод Volcano plot обеспечил установление ЖК мембран Эр, которые могут быть рассмотрены как потенциальные биомаркеры для различения пациентов с АЖБП от здоровых лиц (*табл. 2*). Среди наиболее значимых для дифференцирования оказались мононенасыщенная пальмитолеиновая, суммарное содержание мононенасыщенных ЖК (МНЖК), отношение омега-6 / омега-3 ПНЖК, омега-3 полиненасыщенная докозагексаеновая кислота, насыщенные ЖК арахидиновая, пентадекановая,

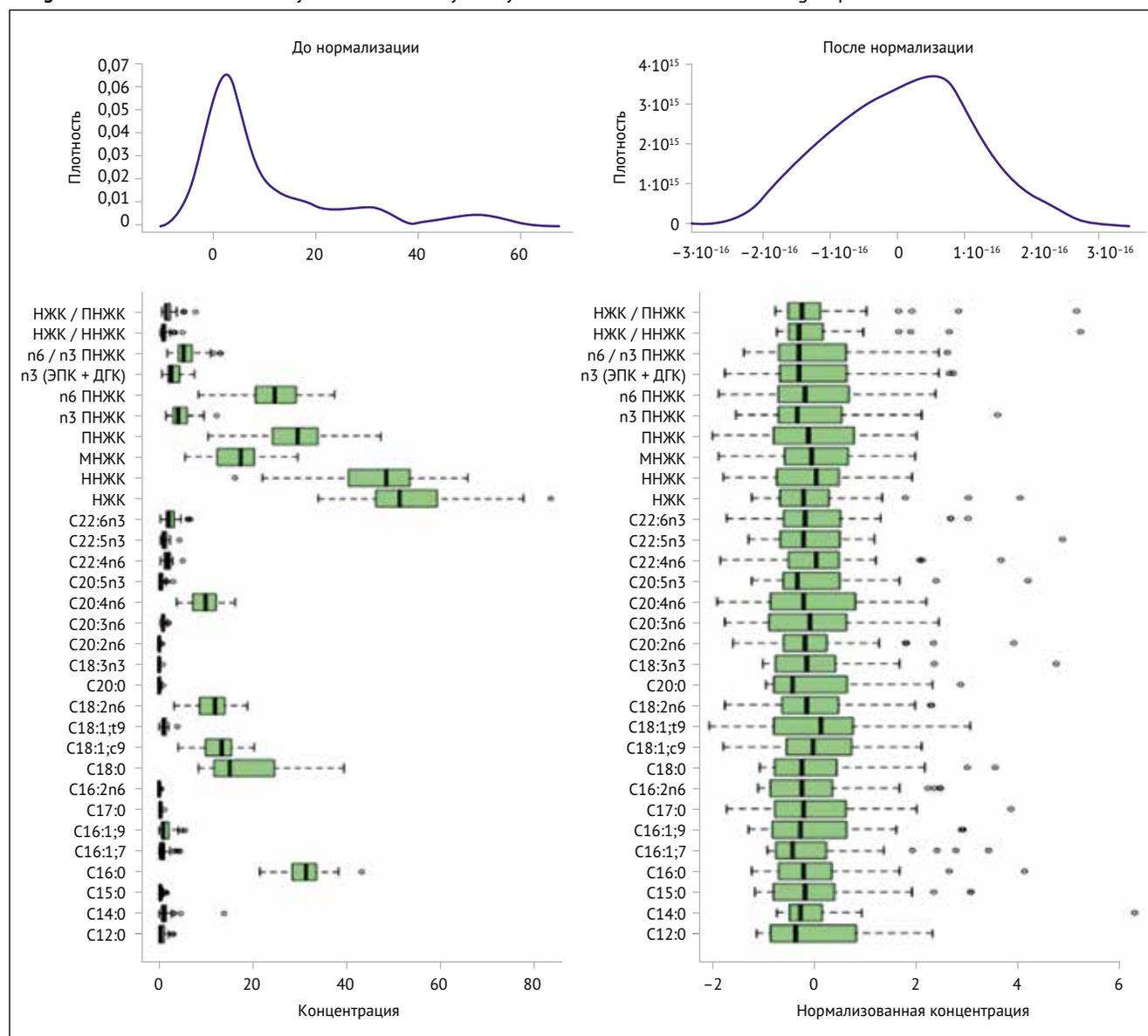
суммарное содержание двух ПНЖК – эйкозапентаеновой (ЕРА) и докозагексаеновой (ДНА), лауриновая ЖК, общее содержание всех омега-3 ПНЖК, маргариновая и омега-3 альфа-линоленовая ЖК. Следует отметить, что содержание пальмитолеиновой, суммы МНЖК, маргариновой, лауриновой, пентадекановой, отношения $n-6/n-3$, альфа-линоленовой оказалось больше, а концентрации арахидиновой, докозагексаеновой, суммы ЕРА и ДНА, суммарное содержание всех омега-3 ПНЖК – меньше у пациентов с АЖБП, чем у мужчин группы сравнения.

● **Таблица 1.** Клинико-биохимические показатели у пациентов с АЖБП и лиц группы сравнения ($M \pm SD$)

● **Table 1.** Clinical and biochemical parameters in patients with alcoholic fatty liver disease and in comparison group ($M \pm SD$)

Показатели	Группа сравнения (n = 28)	Группа пациентов с АЖБП (n = 31)	p
Возраст, лет	47,3 ± 14,3	45,1 ± 17,1	>0,1
Систолическое артериальное давление, мм рт. ст.	122,8 ± 13,7	138,1 ± 15,9	0,0002
Диастолическое артериальное давление, мм рт. ст.	78,5 ± 12,7	86,7 ± 17,6	0,045
Индекс массы тела, кг/м ²	24,2 ± 12,6	26,8 ± 10,8	>0,1
Окружность талии, см	91,8 ± 15,7	95,5 ± 15,4	>0,1
Содержание общего холестерина, мг/дл	162,7 ± 31,2	219,2 ± 39,6	0,00001
Содержание ХС ЛПВП, мг/дл	53,4 ± 13,2	46,87 ± 13,7	>0,1
Содержание ХС ЛПНП, мг/дл	110,91 ± 17,1	145,9 ± 92,4	>0,1
Содержание триглицеридов, мг/дл	151,6 ± 31,2	200,4 ± 81,4	0,028
Содержание глюкозы в крови натощак, ммоль/л	4,6 ± 3,1	5,9 ± 4,4	>0,1
Содержание общего белка, г/л	73,2 ± 10,1	70,5 ± 8,2	>0,1
Содержание альбумина, г/л	44,61 ± 4,3	44,32 ± 3,8	>0,1
Активность АлАТ, Ед/л	14,8 ± 7,9	42,2 ± 19,2	0,00001
Активность АсАТ, Ед/л	12,4 ± 6,8	54,7 ± 15,9	0,00001
Коэффициент Де Ритиса (АСТ/АЛТ)	0,87 ± 0,21	1,18 ± 0,49	0,002
Активность гамма-глутамилтранспептидазы (ГТТП), Ед/л	15,3 ± 9,5	58,9 ± 25,3	0,00001
Активность щелочной фосфатазы, Ед/л	125,2 ± 38,6	163,3 ± 48,4	0,001
Содержание общего билирубина, мкмоль/л	12,9 ± 4,7	22,8 ± 4,3	0,00001
Содержание прямого билирубина, мкмоль/л	3,6 ± 3,1	5,7 ± 3,9	0,026
Содержание мочевой кислоты, мг/дл	171,7 ± 66,1	369,4 ± 68,7	0,000001
Содержание креатинина, мкмоль/л	72,7 ± 14,8	82,1 ± 13,2	0,018
Содержание мочевины, ммоль/л	5,4 ± 7,4	6,1 ± 7,2	>0,1
Содержание железа в сыворотке, мкмоль/л	10,7 ± 7,9	23,8 ± 8,8	0,000001
Эластичность печени, кПа	4,47 ± 3,3	6,92 ± 4,8	0,028

● **Рисунок 1.** Нормализация уровня жирных кислот мембран эритроцитов в обследованных группах
 ● **Figure 1.** Normalization of fatty acid levels of erythrocyte membranes in the examined groups

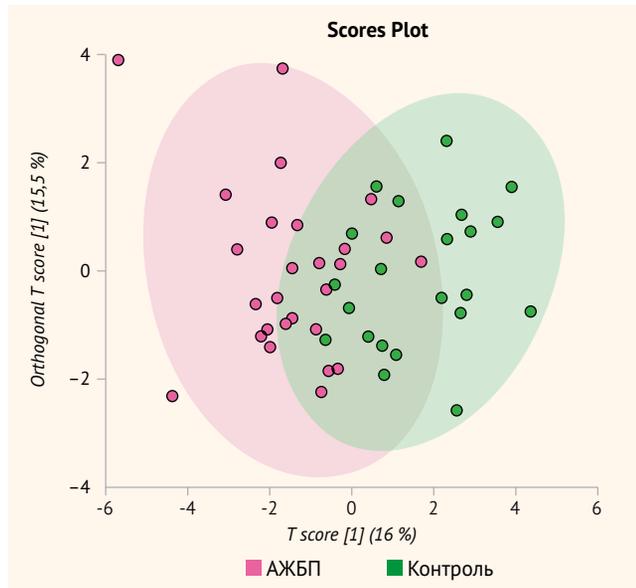


На *рис. 3* визуализировано ранжирование уровней ЖК мембран Эр по степени вклада в различие пациентов с АЖБП от здоровых лиц.

Проведение ROC-анализа с использованием содержания ряда отдельных ЖК обеспечило высокий уровень чувствительности и специфичности при различении пациентов с АЖБП от здоровых лиц: для пальмитолеиновой кислоты площадь под кривой (AUC) составила 0,854, чувствительность 82,6%, специфичность 77,8% (*рис. 4А*); для суммарного содержания МНЖК – AUC 0,804, чувствительность 65,2%, специфичность 81,5% (*рис. 4В*); для арахидоновой кислоты – AUC 0,733, чувствительность 78,3%, специфичность 77,8% (*рис. 4С*). При использовании «панели» ЖК, наиболее значимых для различения пациентов с АЖБП от здоровых лиц (C16:1;9, сумма МНЖК, n6/n3 ПНЖК, C22:6 n-3, C20:0), диагностическая точность составила – AUC 0,808 при достаточно высоких уровнях чувствительности 79% и специфичности 81% (*рис. 4D*).

Корреляционный анализ выявил ассоциации между уровнями ЖК в мембранах Эр (*рис. 5*). Наличие устойчивых «кластеров» на тепловой карте корреляций ЖК (непарная статистика) у пациентов с АЖБП свидетельствует о тесной взаимосвязи и неслучайном сочетании параметров. На *рис. 6* представлены ассоциации уровней пальмитолеиновой ЖК C16:1;9 и арахидоновой C20:0 с содержанием других ЖК. Наиболее тесные положительные ассоциации содержания пальмитолеиновой ЖК в мембранах эритроцитов установлены с насыщенными ЖК – C12:0, C15:0, суммарным содержанием МНЖК, элаидиновой, линолевой, отношением n6/n3 ПНЖК; отрицательные корреляции – с уровнями ряда омега-3 ПНЖК – докозагексаеновой, докозапентаеновой, суммарным содержанием эйкозапентаеновой и докозагексаеновой кислот, суммой всех n3 ПНЖК, а также с рядом омега-6 ПНЖК – докозатетраеновой, докодиеновой, насыщенными ЖК – арахидоновой, стеариновой.

- **Рисунок 2.** Дискриминантный анализ для различия уровня жирных кислот мембран эритроцитов пациентов с АЖБП и здоровых лиц
- **Figure 2.** Discriminant analysis by the least squares method (ortho PLS-DA) to distinguish the fatty acid levels of erythrocyte membranes in patients with AFLD and healthy men

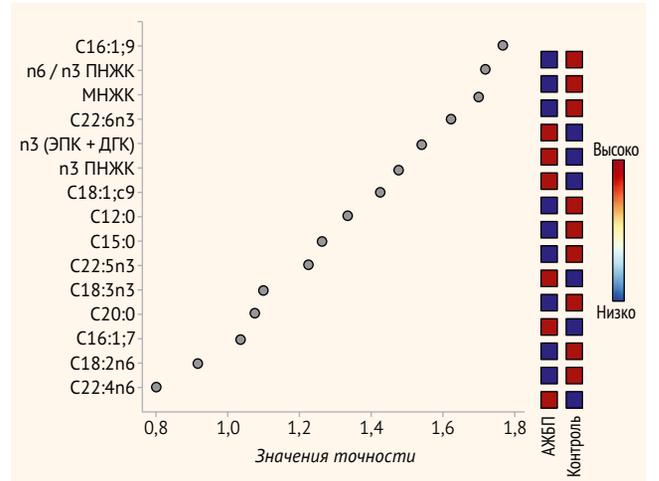


Примечание. Розовое облако, красные точки – содержание ЖК в группе с АЖБП; зеленое облако, зеленые точки – в группе сравнения.

Содержание арахидиновой ЖК прямо коррелировало с уровнями других насыщенных ЖК – стеариновой, пальмитиновой, их суммарным содержанием и индексами НЖК/ННЖК, НЖК/ПНЖК; сильные обратные ассоциации выявлены в отношении ряда мононенасыщенных ЖК – элаидиновой, пальмитолеиновой, их суммарного содержания; насыщенных ЖК – лауриновой, пентадекановой, суммарным содержанием ненасыщенных ЖК, а также омега-6 линолевой ЖК (рис. 6).

Анализ ассоциаций уровней ЖК мембран Эр с биохимическими параметрами позволил выявить корреляции с рядом печеночных проб: содержание C16:1;9, соотношение омега-6 / омега-3 ПНЖК – с активностью АЛТ ($r = -0,655$, $p = 0,029$, $r = -0,536$, $p = 0,05$ соответственно); уровней C12:0, C17:0 – с общим билирубином ($r = -0,545$, $p = 0,049$, $r = -0,449$, $p = 0,05$ соответственно); уровней C17:0, C22:6n3, суммарного содержания омега-3 ПНЖК, суммы омега-3 (ЕРА+DНА) – с уровнем прямого билирубина ($r = -0,429$, $p = 0,042$; $r = -0,643$, $p = 0,005$; $r = -0,686$, $p = 0,019$; $r = -0,581$, $p = 0,019$ соответственно); содержания C16:1;9, C20:0 – с активностью ГТПП ($r = -0,624$, $p = 0,05$; $r = 0,521$, $p = 0,019$ соответственно); уровней C16:1;7, C12:0 – с активностью щелочной фосфатазы ($r = -0,63$, $p = 0,003$; $r = -0,612$, $p = 0,05$ соответственно). Установлены ассоциации содержания ЖК в мембранах Эр с показателями липидного профиля: концентрация альфа-линоленовой кислоты (омега-3 ПНЖК) прямо коррелировала с уровнем ХС ЛПВП ($r = 0,738$, $p = 0,037$); суммарное содержание омега-3 ПНЖК и сумма омега-3 (ЕРА+DНА) обратно связаны с уровнем ХС ЛПНП ($r = -0,53$, $p = 0,037$; $r = -0,62$, $p = 0,037$ соответственно), корреляция отношения омега-6 / омега-3 ПНЖК с ХС ЛПНП оказалась прямой ($r = 0,507$, $p = 0,032$).

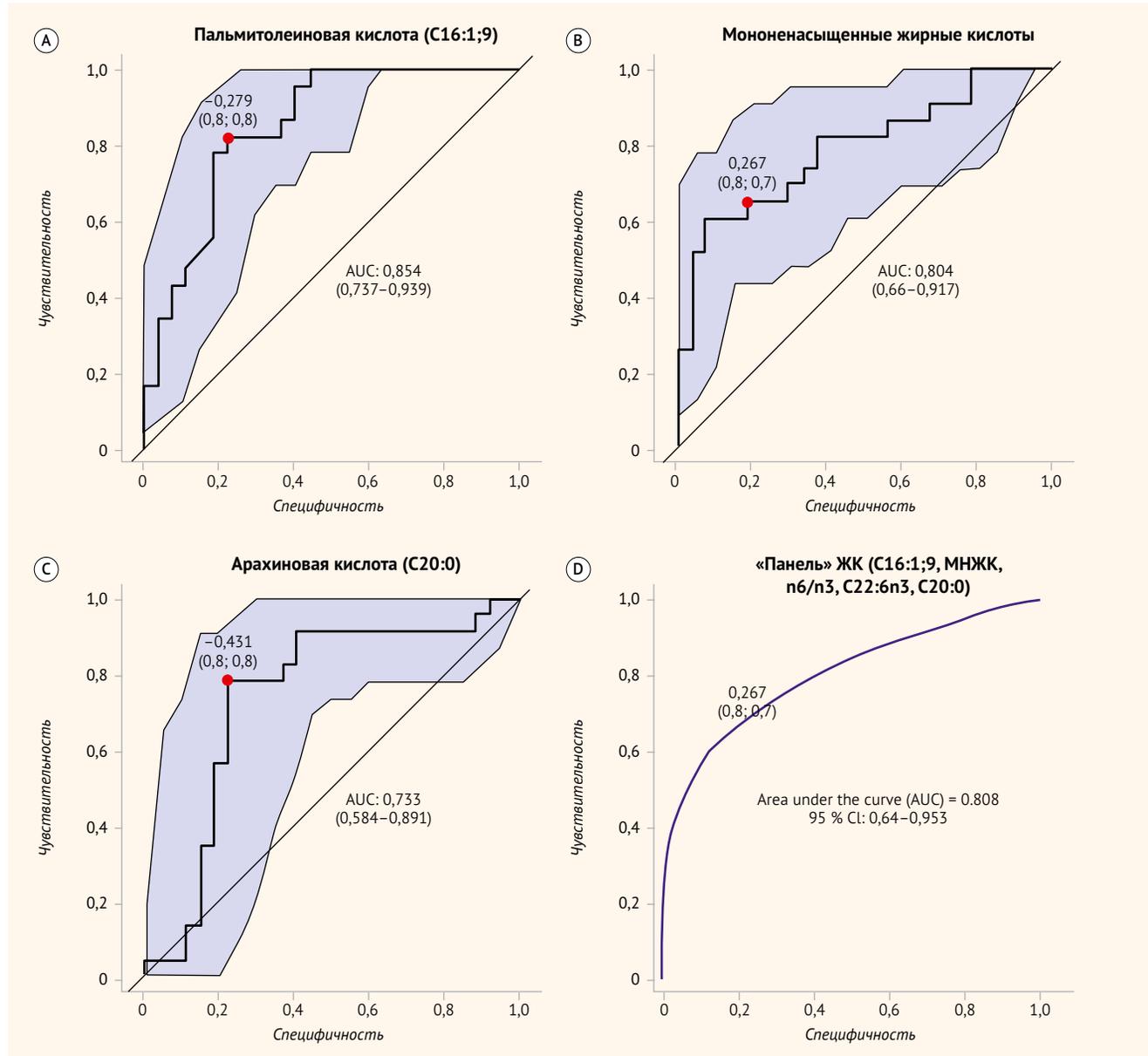
- **Рисунок 3.** Ранжирование уровней жирных кислот мембран эритроцитов в различии пациентов с АЖБП от здоровых лиц (непарная статистика, Random Forest)
- **Figure 3.** Ranking of fatty acid levels of erythrocyte membranes in distinguishing patients with AFLD from healthy individuals (unpaired statistics, Random Forest)



- **Таблица 2.** Жирные кислоты мембран эритроцитов и их соотношения – потенциальные биомаркеры для различия пациентов с АЖБП и здоровых лиц (данные получены при использовании Volcano plot)
- **Table 2.** Fatty acids of erythrocyte membranes and their ratios are potential biomarkers for distinguishing patients with AFLD and healthy men (data obtained using Volcano plot)

ЖК	Кратность изменений	log2(FC)	Значения «р»	-log10(p)
C16:1;9 цис-9-гексадекановая (9-пальмитолеиновая)	0,42988	-1,218	2,22E-05	4,6536
Сумма МНЖК	0,74062	-0,4332	0,000156	3,8063
n-6 / n-3 ПНЖК	0,62015	-0,68932	0,000502	3,2994
C22:6;4,7,10,13,16,19 (n-3) докозагексаеиновая	1,5018	0,58667	0,003468	2,46
C20:0 (эйкозаноиновая, арахиноиновая)	2,3968	1,2611	0,004609	2,3364
C15:0 пентадекановая	0,54908	-0,86491	0,004784	2,3202
Эйкозапентаеиновая + докозагексаеиновая ЖК	1,4353	0,52136	0,00746	2,1273
C12:0 додекановая (лауриноиновая)	0,53677	-0,89764	0,012812	1,8924
Сумма омега-3 ПНЖК	1,3567	0,44009	0,013966	1,8549
C16:1;7 цис-7-гексадекановая (7-пальмитолеиновая)	0,52316	-0,9367	0,018596	1,7306
C17:0 гептадекановая (маргариноиновая)	0,74055	-0,43334	0,029657	1,5279
C18:3;6,9,12 (n-3) октадекатриеноиновая (α -линоленовая)	0,59179	-0,75683	0,050127	1,2586

● **Рисунок 4.** ROC-анализ при использовании уровней жирных кислот мембран эритроцитов для дифференцирования пациентов с АЖБП от здоровых лиц
 ● **Figure 4.** ROC analysis using the levels of fatty acids of erythrocyte membranes to differentiate patients with AFLD from healthy men



ОБСУЖДЕНИЕ

По данным доклада Всемирной организации здравоохранения, алкогольная болезнь печени является основной причиной смерти среди людей, злоупотребляющих алкоголем, и на ее долю приходится около 3,8% общемировой смертности¹. Ранним проявлением алкогольной болезни печени является наличие жировой дистрофии печени (стеатоз печени), которая при продолжающемся приеме алкоголя может прогрессировать. Спектр заболеваний варьирует от жировой дистрофии печени (стеатоза) до алкогольного стеатогепатита, фиброза и цирроза печени [15, 16]. Стеатоз является самой ранней стадией алкогольного заболевания печени и наиболее

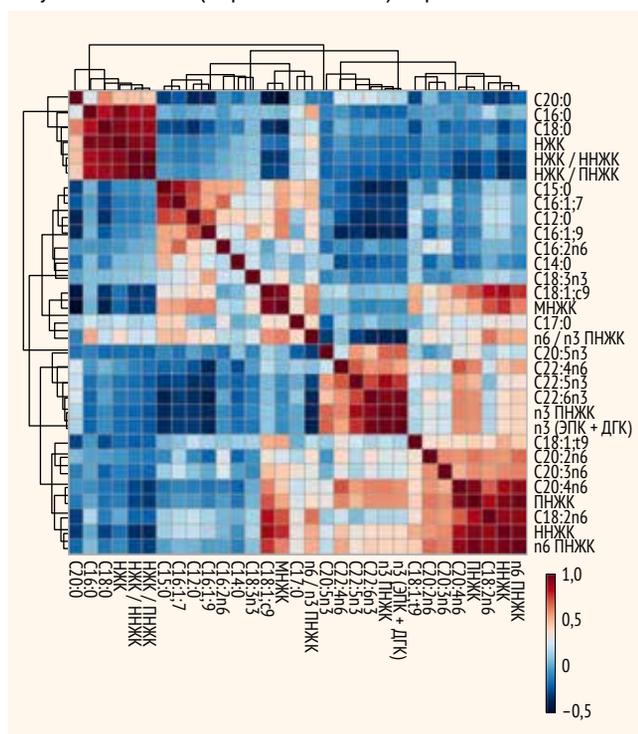
распространенным заболеванием печени, вызванным алкоголем. Стеатоз характеризуется чрезмерным накоплением жира внутри клеток печени. Однако в случае абстиненции это состояние может быть обращено вспять [17]. Вместе с тем стеатозная печень восприимчива к вторичным повреждениям, включая уязвимость к активным формам кислорода (АФК), эндотоксинам кишечного происхождения и адипоцитокинам, таким как фактор некроза опухоли (TNF-α) и другие цитокины [17]. Все эти воздействия вносят существенный вклад в вызванное алкоголем повреждение печени и могут усугубить начальный стеатоз [15, 16].

Одним из факторов, приводящих к прогрессированию алкогольной болезни печени, является токсическое действие свободных жирных кислот, уровень которых в определенной степени коррелирует с жирнокислотным

¹ World Health Organization. The world health report -2002. Reducing risks, promoting healthy life. 2002. Available at: <http://www.who.int/whr/2002/en/>.

● **Рисунок 5.** Тепловая карта (Heatmap) корреляций уровней жирных кислот мембран эритроцитов (непарная статистика) у пациентов с АЖБП

● **Figure 5.** Heatmap of correlations of fatty acid levels of erythrocyte membranes (unpaired statistics) in patients with AFLD



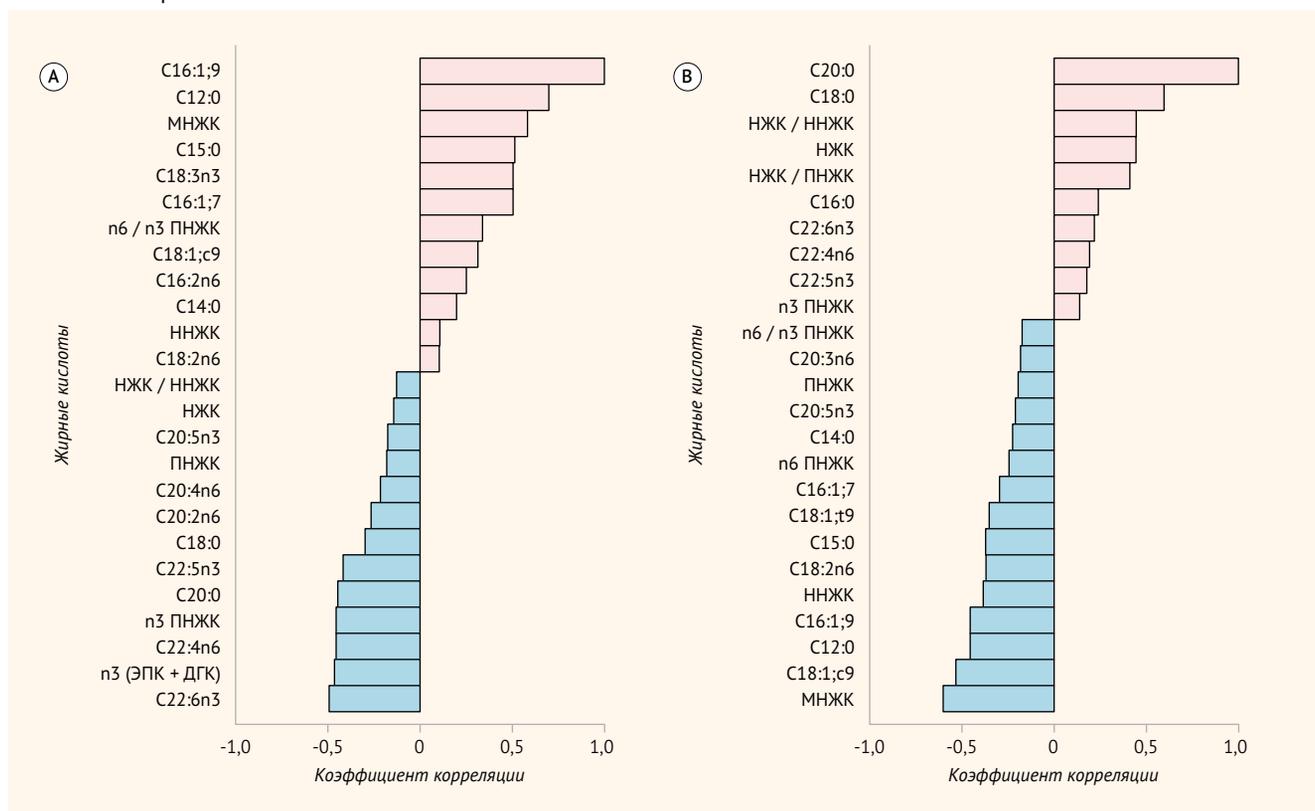
профилем мембран эритроцитов [15]. В настоящем исследовании изучены особенности жирнокислотного состава мембран Эр у пациентов с АЖБП, поскольку состав ЖК мембран Эр считается более стабильным, чем уровни ЖК сыворотки крови, в связи с большей зависимостью последних от диетических привычек [18]. В работу включены пациенты с начальной стадией алкогольной болезни печени – стеатозом и начальными стадиями фиброза печени, поскольку важно понимание ранних сдвигов в липидных метаболитах, когда заболевание обратимо.

По данным нашей работы, у пациентов с АЖБП выявлены повышенные уровни мононенасыщенных ЖК, особенно пальмитолеиновой кислоты. По данным J.J. Lee et al., повышенное содержание последней свидетельствует о высокой активности stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1) и липогенезе de novo [19].

Исследование на мышах R. Guo et al. показало, что обогащение диеты мононенасыщенными ЖК значительно усугубляло вызванную алкоголем дисфункцию печени, о чем свидетельствовали гистологические данные и нарушенные биохимические показатели. Сочетание повышенного уровня МНЖК с алкоголем снижало экспрессию гормон-чувствительной липазы (HSL), фосфорилированной 5'-AMP-активируемой протеинкиназы (p-AMPK) и карнитинпальмитилтрансферазы-1a (CPT1a) и повышали экспрессию в печени белка, связывающего стерол-регуляторный элемент-1c (SREBP-1c), диацилглицеролацилтрансферазы-2 (DGAT2) и рецептора липопротеидов

● **Рисунок 6.** Корреляции пальмитолеиновой C16:1;9 (А) и арахидиновой C20:0 кислот (В) с содержанием других жирных кислот в мембранах эритроцитов пациентов с АЖБП

● **Figure 6.** Correlation of palmitoleic C16:1;9 (A) and arachidonic C20:0 acids (B) with the content of other fatty acids in erythrocyte membranes of patients with AFLD



очень низкой плотности (VLDLR). Подобное сочетание этиологических факторов также способствовало экспрессии печеночного интерлейкина-6 (IL-6) и фактора некроза опухоли печени-альфа (TNF- α) на транскрипционном уровне. Кроме того, липолиз жировой ткани частично оказывал этиологическое воздействие на вызванный алкоголем стеатоз печени при предварительном поступлении повышенного уровня МНЖК. Авторы заключили, что повышенный уровень МНЖК усугублял дисфункцию печени, вызванную алкоголем, *in vivo* [20]. Таким образом, повышенные уровни МНЖК, выявленные в настоящем исследовании, могут быть дополнительными факторами прогрессирования АЖБП.

В нашей работе выявлены повышенные уровни ряда насыщенных жирных кислот в мембранах эритроцитов – лауриновой, пентадекановой, маргариновой и сниженное содержание арахидоновой ЖК. В ряде исследований показана протективная роль насыщенных ЖК при развитии алкогольной болезни печени [21, 22].

При этом роль отдельных НЖК может быть различной. Так, V. Saraswathi et al. в эксперименте на мышах показали, что маркеры воспаления жировой ткани (MCP-1 и IL-6), системной инсулинорезистентности и стеатоза печени были статистически значимо выше при повышенных уровнях пальмитиновой, но не лауриновой ЖК у мышей с ЖБП [23]. W. Yoo et al. показали, что сывороточные уровни 15:0, 17:0 отрицательно коррелировали с показателями активности НАЖБП (баллонной дистрофией гепатоцитов, степенью фиброза печени) и увеличением объема гепатоцитов. В эксперименте на мышах авторы установили, что животные, получавшие диету с добавлением С15:0, показали снижение уровня АСТ и инфильтрацию печени макрофагами, насыщенными цероидами, по сравнению с мышами, не получавшими пентадекановую ЖК, что позволило предположить, что дефицит С15:0 способствует повреждению печени при неалкогольном стеатогепатите [24]. Было показано, что как 15:0, так и 17:0 имеют положительную связь со здоровьем и, в частности, с риском развития диабета 2-го типа и сердечно-сосудистых заболеваний [25–27]. Возможно, при АЖБП также реализуется протективная роль вышеописанных жирных кислот.

В ряде клинических исследований показано, что низкий уровень омега-3 (n-3) полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), включая α -линоленовую кислоту (18:3 n-3), в сыворотке крови и биоптатах ткани печени является общей характеристикой пациентов с алкогольной и неалкогольной болезнью печени [28, 29]. В нашем исследовании выявлены повышенные уровни α -линоленовой кислоты на фоне сниженных эйкозапентаеновой и докозагексаеновой, что может быть связано со снижением активности дельта 6 и 5 десатураз (FADS 2, FADS 1) и элонгаз, что показано в ряде исследований при алкогольном поражении печени [30, 31].

Возможно, добавление n-3 ПНЖК могло бы ослабить стеатоз печени, вызванный воздействием алкоголя. Все большее число исследований посвящено роли длинноцепочечных n-3 ПНЖК (эйкозапентаеновой кислоты

(EPA, 20:5 n-3), докозагексаеновой кислоты (DHA, 22:6 n-3)) при алкогольном стеатозе печени [30, 32–36]. Однако результаты этих работ противоречивы. В нескольких исследованиях сообщалось, что рыбий жир или длинноцепочечные n-3 ПНЖК защищают от развития стеатоза, вызванного алкоголем [32–34]. Ряд авторов показали, что рыбий жир способствует патогенезу вызванного этанолом стеатоза печени и повреждению печени [35, 36].

Исследование M. Wang et al. продемонстрировало, что льняное масло, богатое альфа-линоленовой кислотой (ALA), уменьшает вызванный алкоголем стеатоз печени, улучшая функцию жировой ткани и липидный гомеостаз по оси «жировая ткань – печень» [37]. Авторы показали, что повышенные уровни данной ЖК подавляют стимулируемый этанолом липолиз жировой ткани путем ослабления стресса эндоплазматического ретикулума, что приводит к уменьшению поступления жирных кислот в печень. Поступающая с пищей альфа-линоленовая кислота также способствовала выработке жирового адипонектина путем усиления регуляции экспрессии PPAR γ в жировой ткани, тем самым активируя AMPK в печени. Действительно, ALA служит предшественником для синтеза длинноцепочечных n-3 полиненасыщенных жирных кислот, таких как эйкозапентаеновая (EPA) и докозагексаеновая (DHA). Накопленные клинические данные и исследования на животных продемонстрировали, что пищевые добавки с ALA значительно повышают уровень EPA и ALA в крови и тканях, но не оказывают существенного влияния на уровень DHA [38]. Таким образом, этот защитный эффект диетической альфа-линоленовой кислоты может быть ассоциирован с самой ALA и ее превращением в EPA [37].

Данные, полученные на моделях грызунов с алкогольной болезнью печени, продемонстрировали негативное воздействие омега-6 полиненасыщенных жирных кислот (n-6 ПНЖК), в частности, линолевой кислоты, что может быть частично объяснено повышенными уровнями ее провоспалительных окисленных метаболитов, образующихся по липоксигеназному пути [39, 40]. Меньше известно о роли окисленных метаболитов ПНЖК, образующихся по другим метаболическим путям (например, эпоксигеназы цитохрома P450 (CYPs)) или липидных медиаторах – производных омега-3 полиненасыщенных жирных кислот (n-3 ПНЖК), таких как альфа-линоленовая кислота (ALA), эйкозапентаеновая кислота (EPA) и докозагексаеновая кислота (DHA). Учитывая, что большинство метаболитов ПНЖК являются мощными эндогенными сигнальными молекулами, которые участвуют в нескольких метаболических путях, выявление изменений в специфических липидных метаболитах может пролить новый свет на механизмы, способствующие патогенезу / прогрессированию алкогольной болезни печени, и выявить новые терапевтические мишени и биомаркеры этого заболевания.

У пациентов с АЖБП отмечен повышенный уровень отношения омега-6 / омега-3 ПНЖК на фоне суммарного снижения омега-3 ПНЖК, в том числе, эйкозапентаеновой и докозагексаеновой. Повышенное количество

n-6 ПНЖК приводит к большему образованию биологически активных и потенциально провоспалительных метаболитов, например, эйкозаноидов из арахидоновой кислоты, таких как простагландины, тромбоксаны и лейкотриены. Образование этих соединений превышает выработку n-3 метаболитов, обладающих преимущественно противовоспалительными свойствами [41]. Высокое соотношение n-6 / n-3 ПНЖК может создавать провоспалительную среду, способствующую прогрессированию АЖБП. В последние годы инновационным инструментом для изучения роли омега-3 ПНЖК стало проведение экспериментов с трансгенными мышами fat-1. Эти мыши экспрессируют ген fat-1, который кодирует десатуразу n-3 ПНЖК и катализирует эндогенное превращение n-6 в n-3 ПНЖК, что приводит к увеличению n-3 ПНЖК и последующему снижению соотношения n-6 : n-3 ПНЖК. Острое повреждение печени, вызванное этанолом, было ослаблено у мышей fat-1, возможно, за счет снижения регуляции печеночного липогенеза, воспалительных реакций и окислительного стресса [42]. Недавнее исследование M. Wang et al. [43] продемонстрировало, что как эндогенное обогащение n-3 ПНЖК у мышей fat-1, так и пищевые добавки эйкозапентаеновой и докозагексаеновой ЖК у мышей дикого типа облегчали переход острого алкогольного повреждения печени в хронический стеатоз, уменьшали некровоспалительные нарушения, что подтверждено снижением активности аминотрансфераз, уровня печеночных триглицеридов, а также снижением уровня фактора некроза опухоли альфа (TNF- α), интерлейкина-1 бета (IL-1 β) и белка-хемоаттрактанта моноцитов-1 (MCP-1) в печени. Авторы предположили, что ингибирование этанол-индуцированного липолиза жировой ткани через ось PDE3B-AMPK подчеркивает благотворное влияние n-3 ПНЖК на алкогольный стеатоз печени и повреждение в их экспериментальных моделях.

Роль ПНЖК в развитии и прогрессировании алкогольной жировой болезни печени тесно связана с их производными, в том числе с оксипипинами. В организме человека образование оксипипинов происходит путем ферментативной или неферментативной оксигенации полиненасыщенных жирных кислот семейств омега-6 и омега-3, получаемых с пищей. Являясь «гормонами местного действия», оксипипины участвуют в регуляции процессов воспаления, болевого ответа, клеточной адгезии, миграции и пролиферации, апоптоза, ангиогенеза, регуляции артериального давления, свертываемости крови и проницаемости кровеносных сосудов [44]. В. Gao et al. [45] выявили изменения в уровне оксипипинов у пациентов с алкогольным поражением печени и связь этих изменений с клиническими параметрами, такими как проницаемость кишечника и степень стеатоза и фиброза печени. По сравнению с контрольной группой без АЖБП исследователи отметили значительно повышенные уровни 5-гидрокси-эйкозатетраеновой кислоты (5-HETE), дигидрокси-эйкозатриеновых кислот (5,6-DiHETE) и 4-гидрокси-докозагексаеновой кислоты (4-HDoHE) у пациентов с алкогольным стеатозом, которые были связаны с повышенной проницаемостью кишечника. 9,10-DiHHex (9,10-дигидрокси-гексаеновая

кислота), 8,9-EpETE (8,9-эпокси-эйкозатриеновая кислота), 20-HETE (20-гидрокси-эйкозатетраеновая кислота) были прямо ассоциированы со стеатозом при алкогольном поражении печени. Уровень 20-HETE также положительно коррелировал со степенью стеатоза и полиморфноядерной нейтрофильной инфильтрацией ткани печени по данным биопсии.

Повышенные уровни биоактивных оксиламинов, образующихся ферментативно из линолевой кислоты, главным образом, под действием липоксигеназы 12/15-LOX или неферментативно посредством окисления, ассоциированного со свободными радикалами в ответ на окислительный стресс, связаны с алкогольным поражением печени у людей и грызунов [39, 46, 47]. Повышенные уровни 9- и 13-гидрокси-октадекадиеновой кислоты (9- и 13-HODE) в плазме крови были обнаружены у пациентов с алкогольным циррозом печени, что наблюдалось параллельно с увеличением экспрессии мРНК 15-LOX-1 и 15-LOX-2 в печени. Следует заметить, что содержание HODEs (гидрокси-октадекадиеновые кислоты) в плазме крови у пациентов с алкогольным поражением печени было более чем в 46 раз выше, чем у здоровых людей, и более чем в 4 раза выше, чем у пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени [46]. Кроме того, в этом исследовании также сообщалось, что уровни 5-, 12- и 15-HETEs (окисленных метаболитов арахидоновой кислоты) в плазме крови также были повышены у пациентов с алкогольным поражением печени.

В модели на мышах D.R. Warner et al. [48] выяснили, что сочетание воздействия этанола и ненасыщенными ЖК, в отличие от насыщенных, вызывало повышение активности АЛТ, билирубина в плазме крови, прогрессирование стеатоза печени и воспаление. Авторы связывают эти проявления с повышенными уровнями биоактивных липидных метаболитов – производных ненасыщенных ЖК, обычно участвующих в провоспалительных реакциях. Это подтверждают полученные в нашей работе корреляции уровней ЖК с показателями синдрома цитолиза.

По мнению H. Liu et al., взаимодействие транзитного рецептора потенциала ваниллоидного подтипа 1 (TRPV1) с метаболитами линолевой кислоты (OXLAM) может способствовать прогрессированию от простого стеатоза до стеатогепатита при алкогольном поражении печени [47].

Акролеин, эндогенный метаболит, производное ПНЖК, недавно был идентифицирован как патогенный медиатор алкогольной болезни печени. Исследование, проведенное W.Y. Chen et al. [49], продемонстрировало, что потребление алкоголя приводит к накоплению в ткани печени аддуктов белков с акролеином, что ассоциировано с развитием стеатоза печени, стрессом эндоплазматического ретикула и повреждением печени.

В последние десятилетия появилась информация об участии эндоканнабиноидной системы в патогенезе алкогольного поражения печени. Поскольку эндогенные каннабиноиды являются производными арахидоновой кислоты, связи их с жирнокислотным профилем несомненны. В эксперименте систематическое поступление

этанол увеличивало экспрессию рецептора CB_1 в печени мышей и повышало уровень эндоканнабиноида 2-AG [50]. Кроме того, мыши с глобальным или гепатоцитарно-специфическим нокаутом CB_1 оказались устойчивы к стеатозу, индуцированному этанолом [50]. Сообщалось, что у мышей с нокаутом CB_2 наблюдалось более выраженное повреждение печени после хронического воздействия этанола, включая активацию звездчатых клеток печени и выработку коллагена [51]. Кроме того, активация рецептора CB_2 оказала благоприятное воздействие на вызванное алкоголем воспаление путем ингибирования M_1 поляризации и способствовала переходу к фенотипу M_2 в клетках Купфера [52]. Эти данные указывают на различные эффекты рецепторов CB_1 и CB_2 при алкогольном поражении печени, предполагая защитную роль рецептора CB_2 и что агонисты рецептора CB_2 – перспективные терапевтические препараты для лечения алкогольной болезни печени.

Таким образом, значимость уровней полиненасыщенных жирных кислот в диагностических моделях по различению пациентов с АЖБП от здоровых лиц не случайна. Многие биологические эффекты, опосредованные ПНЖК, могут быть отнесены на счет производных ПНЖК – биоактивных липидных медиаторов (оксилипинов, продуктов перекисного окисления, эндоканнабиноидов, уникальных биоактивных метаболитов ПНЖК бактериального происхождения). Многочисленные производные n-6 ПНЖК, такие как окисленные метаболиты линолевой кислоты, известны своими проапоптотическими и провоспалительными свойствами, в то время как метаболиты n-3 ПНЖК, в совокупности называемые специализированными про-резольвиновыми медиаторами, которые включают резольвины, протектины и марезины, ограничивают воспалительный процесс, фиброгенез при алкогольном поражении печени.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование уровня жирных кислот мембран эритроцитов у пациентов с алкогольной жировой болезнью печени позволило выявить перечень метаболитов, значительно отличающихся от таковых у здоровых мужчин. Установлено более высокое содержание ряда насыщенных жирных кислот (лауриновой, маргариновой, пентадекановой), мононенасыщенных ЖК (пальмитолеиновой, суммарного уровня мононенасыщенных), соотношения омега-6 к омега-3 ПНЖК, альфа-линоленовой ЖК у пациентов с АЖБП по сравнению с группой контроля. Напротив, концентрация насыщенной ЖК – арахидиновой, докозагексаеновой (омега-3), суммарное содержание эйкозапентаеновой и докозагексаеновой омега-3 ПНЖК, суммарный уровень всех омега-3 ПНЖК оказались ниже у больных АЖБП, чем у здоровых мужчин.

Использование уровней отдельных ЖК как маркеров для различения пациентов с АЖБП от здоровых лиц показало высокую диагностическую точность: для пальмитолеиновой кислоты – AUC 0,854, чувствительность 82,6%, специфичность 77,8%; для арахидиновой кислоты – AUC 0,825, чувствительность 84%, специфичность 78%; для суммарного содержания МНЖК – AUC 0,804, чувствительность 65,2%, специфичность 81,5%. Использование «панели» ЖК (C16:1;9, сумма МНЖК, n6/n3 ПНЖК, C22:6 n-3, C20:0) обеспечило достаточно высокие уровни чувствительности (79%) и специфичности (81%) (AUC 0,808).

Выявлены разнонаправленные ассоциации уровней ЖК мембран эритроцитов между собой и с показателями печеночных проб, липидного профиля.

Поступила / Received 04.10.2023
Поступила после рецензирования / Revised 19.10.2023
Принята в печать / Accepted 20.10.2023



Список литературы / References

- Bardach AE, Alcaraz AO, Ciapponi A, Garay OU, Riviere AP, Palacios A et al. Alcohol consumption's attributable disease burden and cost-effectiveness of targeted public health interventions: a systematic review of mathematical models. *BMC Public Health*. 2019;19(1):1378. <https://doi.org/10.1186/s12889-019-7771-4>.
- Kong LZ, Chandimali N, Han YH, Lee DH, Kim JS, Kim SU et al. Pathogenesis, Early Diagnosis, and Therapeutic Management of Alcoholic Liver Disease. *Int J Mol Sci*. 2019;20(11):2712. <https://doi.org/10.3390/ijms20112712>.
- Kang X, Zhong W, Liu J, Song Z, McClain CJ, Kang YJ, Zhou Z. Zinc supplementation reverses alcohol-induced steatosis in mice through reactivating hepatocyte nuclear factor-4alpha and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha. *Hepatology*. 2009;50(4):1241–1250. <https://doi.org/10.1002/hep.23090>.
- Berk PD, Zhou S, Bradbury MW. Increased hepatocellular uptake of long chain fatty acids occurs by different mechanisms in fatty livers due to obesity or excess ethanol use, contributing to development of steatohepatitis in both settings. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2005;116:335–345. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16555625/>.
- Jia Y. The Roles of Epigenetic Regulators and Inflammation in Hepatocellular Carcinoma Tumorigenesis in Patients with Alcoholic Steatohepatitis (ASH) vs Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH). *Clin Oncol Res*. 2019;2(3):2–7. <https://doi.org/10.31487/j.COR.2019.03.04>.
- Hajifathalian K, Torabi Sagvand B, McCullough AJ. Effect of Alcohol Consumption on Survival in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A National Prospective Cohort Study. *Hepatology*. 2019;70(2):511–521. <https://doi.org/10.1002/hep.30226>.
- Rasineni K, Casey CA. Molecular mechanism of alcoholic fatty liver. *Indian J Pharmacol*. 2012;44(3):299–303. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.96297>.
- Dobrowolski P, Prejbisz A, Kuryłowicz A, Baska A, Burchardt P, Chlebus K et al. Metabolic syndrome – a new definition and management guidelines: A joint position paper by the Polish Society of Hypertension, Polish Society for the Treatment of Obesity, Polish Lipid Association, Polish Association for Study of Liver, Polish Society of Family Medicine, Polish Society of Lifestyle Medicine, Division of Prevention and Epidemiology Polish Cardiac Society, "Club 30" Polish Cardiac Society, and Division of Metabolic and Bariatric Surgery Society of Polish Surgeons. *Arch Med Sci*. 2022;18(5):1133–1156. <https://doi.org/10.5114/aoms/152921>.
- Arab L, Akbar J. Biomarkers and the measurement of fatty acids. *Public Health Nutr*. 2002;5(6A):865–871. <https://doi.org/10.1079/phn2002391>.
- Dietrich CF, Bamber J, Berzigotti A, Bota S, Cantisani V, Castera L et al. EFSUMB Guidelines and Recommendations on the Clinical Use of Liver Ultrasound Elastography, Update 2017 (Long Version). EFSUMB-Leitlinien und Empfehlungen zur klinischen Anwendung der Leberelastographie, Update 2017 (Langversion). *Ultraschall Med*. 2017;38(4):e16–e47. <https://doi.org/10.1055/s-0043-103952>.
- Кручинина МВ, Кручинин ВН, Прудникова ЯИ, Громов АА, Шашков МВ, Соколова АС. Исследование уровня жирных кислот мембран эритроцитов и сыворотки крови у пациентов с колоректальным раком г. Новосибирска. *Успехи молекулярной онкологии*. 2018;5(2):50–61. <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2018-5-2-50-61>.
- Kruchinina MV, Kruchinin VN, Prudnikova YI, Gromov AA, Shashkov MV, Sokolova AS. Study of the level of fatty acids in erythrocyte membranes and

- serum of patients with colorectal cancer in novosibirsk. *Uspehi Molekularnoy Onkologii*. 2018;5(2):50–61. (In Russ.) <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2018-5-2-50-61>.
12. Breiman L. Random Forests. *Machine Learning*. 2001;45:5–32. <https://doi.org/10.1023/A:1010933404324>.
 13. Leoni S, Tovoli F, Napoli L, Serio I, Ferri S, Bolondi L. Current guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review with comparative analysis. *World J Gastroenterol*. 2018;24(30):3361–3373. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i30.3361>.
 14. Подымова СД. *Болезни печени*. Изд. 5-е, перераб. и доп. М.: МИА; 2018. 984 с.
 15. Sozio M, Crabb DW. Alcohol and lipid metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008;295(1):E10–E16. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00011.2008>.
 16. French SW. Ethanol and hepatocellular injury. *Clin Lab Med*. 1996;16(2):289–306. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8792073>.
 17. Zhou Z, Wang L, Song Z, Lambert JC, McClain CJ, Kang YJ. A critical involvement of oxidative stress in acute alcohol-induced hepatic TNF- α production. *Am J Pathol*. 2003;163(3):1137–1146. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)63473-6](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)63473-6).
 18. Katan MB, van Birgelen A, Deslypere JP, Penders M, van Staveren WA. Biological markers of dietary intake, with emphasis on fatty acids. *Ann Nutr Metab*. 1991;35(5):249–252. <https://doi.org/10.1159/000177653>.
 19. Lee JJ, Lambert JE, Hovhannisyun Y, Ramos-Roman MA, Trombld JR, Wagner DA, Parks EJ. Palmitoleic acid is elevated in fatty liver disease and reflects hepatic lipogenesis. *Am J Clin Nutr*. 2015;101(1):34–43. <https://doi.org/10.3945/ajcn.114.092262>.
 20. Guo R, Chen L, Zhu J, Li J, Ding Q, Chang K et al. Monounsaturated fatty acid-enriched olive oil exacerbates chronic alcohol-induced hepatic steatosis and liver injury in C57BL/6J mice. *Food Funct*. 2023;14(5):1573–1583. <https://doi.org/10.1039/d2fo03323b>.
 21. Ronis MJ, Korourian S, Zipperman M, Hakkak R, Badger TM. Dietary saturated fat reduces alcoholic hepatotoxicity in rats by altering fatty acid metabolism and membrane composition. *J Nutr*. 2004;134(4):904–912. <https://doi.org/10.1093/jn/134.4.904>.
 22. Chen P, Torralba M, Tan J, Embree M, Zengler K, Stärkel P et al. Supplementation of saturated long-chain fatty acids maintains intestinal eubiosis and reduces ethanol-induced liver injury in mice. *Gastroenterology*. 2015;148(1):203–214.e16. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.09.014>.
 23. Saraswathi V, Kumar N, Gopal T, Bhatt S, Ai W, Ma C et al. Lauric Acid versus Palmitic Acid: Effects on Adipose Tissue Inflammation, Insulin Resistance, and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Obesity. *Biology (Basel)*. 2020;9(11):346. <https://doi.org/10.3390/biology9110346>.
 24. Yoo W, Gjuka D, Stevenson HL, Song X, Shen H, Yoo SY et al. Fatty acids in non-alcoholic steatohepatitis: Focus on pentadecanoic acid. *PLoS ONE*. 2017;12(12):e0189965. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189965>.
 25. Jenkins B, West JA, Koulman A. A review of odd-chain fatty acid metabolism and the role of pentadecanoic Acid (c15:0) and heptadecanoic Acid (c17:0) in health and disease. *Molecules*. 2015;20(2):2425–2444. <https://doi.org/10.3390/molecules20022425>.
 26. Khaw KT, Friesen MD, Riboli E, Luben R, Wareham N. Plasma phospholipid fatty acid concentration and incident coronary heart disease in men and women: the EPIC-Norfolk prospective study. *PLoS Med*. 2012;9(7):e1001255. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001255>.
 27. Forouhi NG, Koulman A, Sharp SJ, Imamura F, Kröger J, Schulze MB et al. Differences in the prospective association between individual plasma phospholipid saturated fatty acids and incident type 2 diabetes: the EPIC-InterAct case-cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2014;2(10):810–818. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(14\)70146-9](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(14)70146-9).
 28. Shapiro H, Tehilla M, Attal-Singer J, Bruck R, Luzzatti R, Singer P. The therapeutic potential of long-chain omega-3 fatty acids in nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Nutr*. 2011;30(1):6–19. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2010.06.001>.
 29. Lakshman MR. Some novel insights into the pathogenesis of alcoholic steatosis. *Alcohol*. 2004;34(1):45–48. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2004.08.004>.
 30. Huang LL, Wan JB, Wang B, He CW, Ma H, Li TW, Kang JX. Suppression of acute ethanol-induced hepatic steatosis by docosahexaenoic acid is associated with downregulation of stearoyl-CoA desaturase 1 and inflammatory cytokines. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2013;88(5):347–353. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2013.02.002>.
 31. Kirpich IA, Miller ME, Cave MC, Joshi-Barve S, McClain CJ. Alcoholic Liver Disease: Update on the Role of Dietary Fat. *Biomolecules*. 2016;6(1):1. <https://doi.org/10.3390/biom6010001>.
 32. Song BJ, Moon KH, Olsson NU, Salem N Jr. Prevention of alcoholic fatty liver and mitochondrial dysfunction in the rat by long-chain polyunsaturated fatty acids. *J Hepatol*. 2008;49(2):262–273. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2008.04.023>.
 33. Wada S, Yamazaki T, Kawano Y, Miura S, Ezaki O. Fish oil fed prior to ethanol administration prevents acute ethanol-induced fatty liver in mice. *J Hepatol*. 2008;49(3):441–450. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2008.04.026>.
 34. Sekiya M, Yahagi N, Matsuzaka T, Najima Y, Nakakuki M, Nagai R et al. Polyunsaturated fatty acids ameliorate hepatic steatosis in obese mice by SREBP-1 suppression. *Hepatology*. 2003;38(6):1529–1539. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2003.09.028>.
 35. Sachan DS, Yatim AM, Daily JW. Comparative effects of dietary corn oil, safflower oil, fish oil and palm oil on metabolism of ethanol and carnitine in the rat. *J Am Coll Nutr*. 2002;21(3):233–238. <https://doi.org/10.1080/07315724.2002.10719215>.
 36. Nanji AA, Zhao S, Sadrzadeh SM, Dannenberg AJ, Tahan SR, Waxman DJ. Markedly enhanced cytochrome P450 2E1 induction and lipid peroxidation is associated with severe liver injury in fish oil-ethanol-fed rats. *Alcohol Clin Exp Res*. 1994;18(5):1280–1285. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1994.tb00119.x>.
 37. Dietary α -linolenic acid-rich flaxseed oil prevents against alcoholic hepatic steatosis via ameliorating lipid homeostasis at adipose tissue-liver axis in mice. *Sci Rep*. 2016;6:26826. <https://doi.org/10.1038/srep26826>.
 38. Taylor CG, Noto AD, Stringer DM, Froese S, Malcolmson L. Dietary milled flaxseed and flaxseed oil improve N-3 fatty acid status and do not affect glycemic control in individuals with well-controlled type 2 diabetes. *J Am Coll Nutr*. 2010;29(1):72–80. <https://doi.org/10.1080/07315724.2010.10719819>.
 39. Warner DR, Liu H, Miller ME, Ramsden CE, Gao B, Feldstein AE et al. Dietary Linoleic Acid and Its Oxidized Metabolites Exacerbate Liver Injury Caused by Ethanol via Induction of Hepatic Proinflammatory Response in Mice. *Am J Pathol*. 2017;187(10):2232–2245. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.06.008>.
 40. Zhang W, Zhong W, Sun Q, Sun X, Zhou Z. Hepatic overproduction of 13-HODE due to ALOX15 upregulation contributes to alcohol-induced liver injury in mice. *Sci Rep*. 2017;7(1):8976. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02759-0>.
 41. Bradbury MW. Lipid metabolism and liver inflammation. I. Hepatic fatty acid uptake: possible role in steatosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;290(2):G194–G198. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00413.2005>.
 42. Huang W, Wang B, Li X, Kang JX. Endogenously elevated n-3 polyunsaturated fatty acids alleviate acute ethanol-induced liver steatosis. *Biofactors*. 2015;41(6):453–462. <https://doi.org/10.1002/biof.1246>.
 43. Wang M, Zhang X, Ma LJ, Feng RB, Yan C, Su H et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids ameliorate ethanol-induced adipose hyperlipolysis: A mechanism for hepatoprotective effect against alcoholic liver disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2017;1863(12):3190–3201. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.08.026>.
 44. Gabbs M, Leng S, Devassy JG, Monirujjaman M, Aukema HM. Advances in Our Understanding of Oxylipins Derived from Dietary PUFAs. *Adv Nutr*. 2015;6(5):513–540. <https://doi.org/10.3945/an.114.007732>.
 45. Gao B, Lang S, Duan Y, Wang Y, Shawcross DL, Louvet A et al. Serum and Fecal Oxylipins in Patients with Alcohol-Related Liver Disease. *Dig Dis Sci*. 2019;64(7):1878–1892. <https://doi.org/10.1007/s10620-019-05638-y>.
 46. Raszeja-Wyszomirska J, Safranow K, Milkiewicz M, Milkiewicz P, Szykowska A, Stachowska E. Lipidic last breath of life in patients with alcoholic liver disease. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2012;99(1-2):51–56. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2012.06.001>.
 47. Liu H, Beier JL, Arteel GE, Ramsden CE, Feldstein AE, McClain CJ, Kirpich IA. Transient receptor potential vanilloid 1 gene deficiency ameliorates hepatic injury in a mouse model of chronic binge alcohol-induced alcoholic liver disease. *Am J Pathol*. 2015;185(1):43–54. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.09.007>.
 48. Warner DR, Liu H, Ghosh Dastidar S, Warner JB, Prodan MAI, Yin X et al. Ethanol and unsaturated dietary fat induce unique patterns of hepatic ω -6 and ω -3 PUFA oxylipins in a mouse model of alcoholic liver disease. *PLoS ONE*. 2018;13(9):e0204119. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204119>.
 49. Chen WY, Zhang J, Ghare S, Barve S, McClain C, Joshi-Barve S. Acrolein Is a Pathogenic Mediator of Alcoholic Liver Disease and the Scavenger Hydralazine Is Protective in Mice. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2016;2(5):685–700. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2016.05.010>.
 50. Jeong WI, Osei-Hyiaman D, Park O, Liu J, Bătkaï S, Mukhopadhyay P et al. Paracrine activation of hepatic CB1 receptors by stellate cell-derived endocannabinoids mediates alcoholic fatty liver. *Cell Metab*. 2008;7(3):227–235. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.12.007>.
 51. Trebiccka J, Racz I, Siegmund SV, Cara E, Granzow M, Schierwagen R et al. Role of cannabinoid receptors in alcoholic hepatic injury: steatosis and fibrogenesis are increased in CB2 receptor-deficient mice and decreased in CB1 receptor knockouts. *Liver Int*. 2011;31(6):860–870. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2011.02496.x>.
 52. Louvet A, Teixeira-Clerc F, Chobert MN, Deveaux V, Pavoiné C, Zimmer A et al. Cannabinoid CB2 receptors protect against alcoholic liver disease by regulating Kupffer cell polarization in mice. *Hepatology*. 2011;54(4):1217–1226. <https://doi.org/10.1002/hep.24524>.

Вклад авторов:

Концепция статьи – М.В. Кручинина, А.В. Белковец, Н.Ю. Николаев
 Концепция и дизайн исследования – М.В. Кручинина, А.В. Белковец, Н.Ю. Николаев, А.К. Овсянникова
 Написание текста – М.В. Кручинина, М.В. Паруликова, Н.Ю. Николаев
 Сбор и обработка материала – М.В. Кручинина, М.В. Паруликова, А.В. Белковец
 Обзор литературы – М.В. Кручинина, Н.Ю. Николаев
 Перевод на английский язык – М.В. Кручинина, А.В. Белковец
 Анализ материала – М.В. Кручинина, Н.Ю. Николаев, А.В. Белковец, А.К. Овсянникова
 Статистическая обработка – М.В. Кручинина, Н.Ю. Николаев
 Редактирование – М.В. Кручинина, М.В. Паруликова
 Утверждение окончательного варианта статьи – М.В. Кручинина, Н.Ю. Николаев, А.В. Белковец, А.К. Овсянникова

Contribution of authors:

Concept of the article – Margarita V. Kruchinina, Anna V. Belkovets, Konstantin Yu. Nikolaev
 Study concept and design – Margarita V. Kruchinina, Anna V. Belkovets, Konstantin Yu. Nikolaev, A.K. Ovsyannikova
 Text development – Margarita V. Kruchinina, Marina V. Parulikova, Konstantin Yu. Nikolaev
 Collection and processing of material – Margarita V. Kruchinina, Marina V. Parulikova, Anna V. Belkovets
 Literature review – Margarita V. Kruchinina, Konstantin Yu. Nikolaev
 Translation into English – Margarita V. Kruchinina, Anna V. Belkovets
 Material analysis – Margarita V. Kruchinina, Konstantin Yu. Nikolaev, Anna V. Belkovets, A.K. Ovsyannikova
 Statistical processing – Margarita V. Kruchinina, Konstantin Yu. Nikolaev
 Editing – Margarita V. Kruchinina, Marina V. Parulikova
 Approval of the final version of the article – Margarita V. Kruchinina, Konstantin Yu. Nikolaev, Anna V. Belkovets, Alla K. Ovsyannikova

Информация об авторах:

Кручинина Маргарита Витальевна, д.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией гастроэнтерологии, Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук; 630089, Россия, Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, д. 175/1; профессор кафедры пропедевтики внутренних болезней, Новосибирский государственный медицинский университет; 630091, Россия, Новосибирск, Красный проспект, д. 52; kruchmargo@yandex.ru

Паруликова Марина Владимировна, старший преподаватель Отдела образования, врач-гастроэнтеролог, Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук; 630089, Россия, Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, д. 175/1; m_parulikova@mail.ru

Белковец Анна Владимировна, д.м.н., доцент, старший научный сотрудник лаборатории гастроэнтерологии, заведующая клиникой, Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук; 630089, Россия, Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, д. 175/1; профессор кафедры пропедевтики внутренних болезней, Новосибирский государственный медицинский университет; 630091, Россия, Новосибирск, Красный проспект, д. 52; a_belkovets@bk.ru

Николаев Константин Юрьевич, д.м.н., профессор, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией неотложной терапии, Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук; 630089, Россия, Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, д. 175/1; nikolaevky@yandex.ru

Овсянникова Алла Константиновна, д.м.н., доцент, старший научный сотрудник лаборатории клинико-популяционных и профилактических исследований терапевтических и эндокринных заболеваний, Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук; 630089, Россия, Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, д. 175/1; aknikolaeva@bk.ru

Information about the authors:

Margarita V. Kruchinina, Dr. Sci. (Med.), Associate Professor, Leading Researcher, Head of the Laboratory of Gastroenterology, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; 175/1, Boris Bogatkov St., Novosibirsk, 630089, Russia; Professor of the Department of Propaedeutics of Internal Diseases, Novosibirsk State Medical University; 52, Krasny Ave., Novosibirsk, 630091, Russia; kruchmargo@yandex.ru

Marina V. Parulikova, Senior Lecturer of the Department of Education, gastroenterologist, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; 175/1, Boris Bogatkov St., Novosibirsk, 630089, Russia; m_parulikova@mail.ru

Anna V. Belkovets, Dr. Sci. (Med.), Associate Professor, Senior Researcher at the Laboratory of Gastroenterology, Head of the Clinic, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; 175/1, Boris Bogatkov St., Novosibirsk, 630089, Russia; Professor of the Department of Propaedeutics of Internal Diseases, Novosibirsk State Medical University; 52, Krasny Ave., Novosibirsk, 630091, Russia; a_belkovets@bk.ru

Konstantin Yu. Nikolaev, Dr. Sci. (Med.), Professor, Chief Researcher, Head of the Laboratory of Emergency Therapy, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; 175/1, Boris Bogatkov St., Novosibirsk, 630089, Russia; nikolaevky@yandex.ru

Alla K. Ovsyannikova, Dr. Sci. (Med.), Associate Professor, Senior Researcher at the Laboratories of Clinical, Population and Preventive Studies of Therapeutic and Endocrine Diseases, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; 175/1, Boris Bogatkov St., Novosibirsk, 630089, Russia; aknikolaeva@bk.ru