

Диагностические модели для дифференцирования жировой болезни печени алкогольного и неалкогольного генеза

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

М.Ф. Осипенко², <https://orcid.org/0000-0002-5156-2842>, ngma@bk.ru

М.В. Паруликова^{1,2}, m_parulikova@mail.ru

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

Э.В. Кручинина², elinakruch@yandex.ru

¹ Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины Федерального исследовательского центра Института 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. Жировая болезнь печени вносит наибольший вклад в бремя хронической патологии печени во всем мире. Имеющиеся в распоряжении подходы не позволяют в достаточной степени дифференцировать алкогольную и неалкогольную этиологию процесса.

Цель. Создать диагностические панели, включающие электрические и вязкоупругие параметры эритроцитов, для различения жировой болезни печени алкогольного и неалкогольного генеза.

Материалы и методы. Обследованы 38 мужчин (47,5 ± 2,9 года) с неалкогольной жировой болезнью печени (НАЖБП); 31 мужчина с алкогольной жировой болезнью печени (АЖБП) (45,1 ± 3,1 года) по данным УЗИ органов брюшной полости, степень фиброза не превышала F1 (FibroScan® 502). Электрические, вязкоупругие параметры эритроцитов исследованы методом диэлектрофореза с использованием электрооптической системы детекции клеток. Для определения параметров эритроцитов – биомаркеров для различения АЖБП и НАЖБП использована система методов машинного обучения Random Forest.

Результаты. Установлены электрические, вязкоупругие показатели эритроцитов, являющиеся биомаркерами для различения АЖБП и НАЖБП: емкость клеточной мембраны ($p = 1,21E-11$), степень изменения амплитуды деформации на частоте 5×10^5 Гц ($p = 2,38E-08$), поляризуемость клеток на частоте 10^6 Гц ($p = 9,38E-08$), скорость движения эритроцитов к электродам ($p = 4,32E-06$), величина дипольного момента ($p = 1,66E-05$), относительная поляризуемость ($p = 2,35E-05$), индекс деструкции эритроцитов на частоте 5×10^5 Гц ($p = 0,016$), положение равновесной частоты ($p = 2,13E-06$). Диагностическая модель, включающая пять параметров: положение равновесной частоты, поляризуемость клеток на частоте 10^6 Гц, электропроводность клеток, емкость мембран, степень изменения амплитуды деформации на частоте 5×10^5 Гц, – обеспечила наиболее высокую диагностическую точность с AUC 0,975, чувствительностью 96,3%, специфичностью 91,8% при дифференцировании АЖБП и НАЖБП.

Выводы. Таким образом, систематическое воздействие алкоголя модифицирует структуру мембран эритроцитов, приводя к снижению поверхностного заряда, барьерной функции мембран, снижая резистентность клеток, их способность к деформации, что обуславливает ключевую роль выявленных электрических, вязкоупругих параметров эритроцитов в дифференцировании АЖБП и НАЖБП.

Ключевые слова: жировая болезнь печени, алкогольная этиология, неалкогольная этиология, дифференциальная диагностика, клетки красной крови, диэлектрофорез, диагностические панели

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

Для цитирования: Кручинина МВ, Осипенко МФ, Паруликова МВ, Белковец АВ, Кручинина ЭВ. Диагностические модели для дифференцирования жировой болезни печени алкогольного и неалкогольного генеза. *Медицинский совет.* 2024;18(15):80–93. <https://doi.org/10.21518/ms2024-397>.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Diagnostic models for differentiating fatty liver disease of alcohol and non-alcoholic genesis

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

Marina F. Osipenko², <https://orcid.org/0000-0002-5156-2842>, ngma@bk.ru

Marina V. Parulikova^{1,2}, m_parulikova@mail.ru

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

Elina V. Kruchinina², elinakruch@yandex.ru

¹ Research Institute of Internal and Preventive Medicine – Branch of the 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. Fatty liver disease is the largest contributor to the burden of chronic liver disease worldwide. Current approaches do not allow sufficient differentiation between alcoholic and non-alcoholic etiology of the process.

Aim. Create diagnostic panels including electrical and viscoelastic parameters of erythrocytes to differentiate fatty liver disease of alcoholic and non-alcoholic genesis.

Materials and methods. The study included 38 men (47.5 ± 2.9 years) with NAFLD; 31 men with alcoholic fatty liver disease (AFLD) (45.1 ± 3.1 years) according to ultrasound of the abdominal organs, the degree of fibrosis did not exceed F1 (FibroScan® 502). Electrical and viscoelastic parameters of erythrocytes were studied by dielectrophoresis using an electro-optical cell detection system. To determine the parameters of erythrocytes – biomarkers for distinguishing between AFLD and NAFLD, a system of machine learning methods – Random Forest was used.

Results. Electrical, viscoelastic parameters of erythrocytes, which are biomarkers for distinguishing between AFLD and NAFLD, were established: cell membrane capacity ($p = 1.21E-11$), the degree of change in the deformation amplitude at a frequency of 5×10^5 Hz ($p = 2.38E-08$), cell polarizability at a frequency of 10^6 Hz ($p = 9.38E-08$), the speed of erythrocyte movement to the electrodes ($p = 4.32E-06$), the magnitude of the dipole moment ($p = 1.66E-05$), relative polarizability ($p = 2.35E-05$), the index of erythrocyte destruction at a frequency of 5×10^5 Hz ($p = 0.016$), the position of the crossover frequency ($p = 2.13E-06$). The diagnostic model, including five parameters – the position of the crossover frequency, cell polarizability at a frequency of 10^6 Hz, cell electrical conductivity, membrane capacity, the degree of change in the deformation amplitude at a frequency of 5×10^5 Hz, provided the highest diagnostic accuracy with an AUC of 0.975, a sensitivity of 96.3%, and a specificity of 91.8% in differentiating between AFLD and NAFLD.

Conclusion. Thus, systematic exposure to alcohol modifies the structure of erythrocyte membranes, leading to a decrease in the surface charge, the barrier function of membranes, reducing the resistance of cells, their ability to deform, which determines the key role of the identified electrical, viscoelastic parameters of erythrocytes in differentiating between AFLD and NAFLD.

Keywords: fatty liver disease, alcoholic etiology, non-alcoholic etiology, differential diagnostics, red blood cells, dielectrophoresis, diagnostic panels

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

For citation: Kruchinina MV, Osipenko MF, Parulikova MV, Belkovets AV, Kruchinina EV. Diagnostic models for differentiating fatty liver disease of alcohol and non-alcoholic genesis. *Meditinskiy Sovet.* 2024;18(15):80–93. (In Russ.) <https://doi.org/10.21518/ms2024-397>.

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

ВВЕДЕНИЕ

Неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) и алкогольная болезнь печени (АБП) вносят наибольший вклад в бремя хронической патологии печени во всем мире [1, 2]. За последние годы отмечен рост числа случаев обоих заболеваний в разных странах, что ассоциировано с увеличением уровня цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК), превосходя показатели вирусных гепатитов как основных этиологий, приводящих к этим состояниям [3].

В настоящее время НАЖБП определяется наличием стеатоза, связанного с перечнем гистопатологических нарушений в печеночной ткани, включая воспалительные инфильтраты, фиброз различной степени и изменение архитектоники печеночной долики [1]. Вышеописанные особенности развиваются у пациентов, у которых исключены известные факторы, ассоциированные с накоплением жира, включая потребление алкоголя, диффузные заболевания печени вирусного генеза и наследственные патологии. НАЖБП обычно рассматривают в рамках метаболического синдрома (МС), включающего

ожирение, инсулинорезистентность (ИР), СД2 и дислипидемию [4]. По оценкам, у 7–30% пациентов с НАЖБП может развиваться воспалительный подтип, называемый неалкогольным стеатогепатитом (НАСГ), который характеризуется наличием баллонной дистрофии клеток и лобулярного воспаления [5], с большим потенциалом прогрессии до выраженного фиброза и цирроза печени [6]. Пациенты с НАЖБП, особенно с НАСГ, имеют повышенную смертность из-за заболеваний печени и сердечно-сосудистой патологии [7]. M. Ekstedt et al. показали, что пациенты с НАСГ имеют более высокий риск развития СД2, чем лица со стеатозом [8]. НАСГ ассоциирован с более высокой распространенностью (ОШ 2,53, 95% ДИ 1,58–4,05) и частотой (ОР 2,12, 95% ДИ 1,42–3,17) хронической болезни почек [9].

АБП поражает 2–2,5% населения в целом и имеет большую распространенность в странах с более высоким потреблением алкогольных напитков [10]. Среди пациентов с терминальной стадией патологии печени алкоголь является этиологическим фактором более чем в 50% случаев [11]. АБП вызвана выраженным хроническим потреблением алкоголя, которое подразумевает более 3 стандартных порций алкоголя в день у мужчин и более 2 порций в день у женщин или запойное потребление алкоголя (более 5 стандартных порций у мужчин и более 4 порций у женщин в течение двух часов) [12]. Клинические проявления варьируют от отсутствия симптомов до тяжелого острого алкогольного гепатита (ОАГ) с циррозом печени или без него [10]. В ряде исследований доказано, что именно алкогольный генез заболеваний печени ассоциирован с большей скоростью развития фиброза, как и с более выраженным потенциалом прогрессирования в аденокарциному по сравнению с неалкогольной этиологией [13].

В июне 2023 г. был предложен термин *Steatotic liver disease (SLD)* (стеатотическая, или стеатозная, болезнь печени), включающий состояния с разными этиологическими факторами развития стеатоза (кардиометаболические, алкоголь, вирусы гепатита и др.). В соответствии с различным генезом были выделены отдельные варианты SLD: стеатотическая болезнь печени, ассоциированная с метаболической дисфункцией (*Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease, MASLD*), заменившая термин НАЖБП, что предполагает наличие стеатоза печени в сочетании по меньшей мере с одним кардиометаболическим фактором риска при отсутствии другой заметной причины. Экспертами предложена новая категория для сочетания MASLD с алкогольной болезнью печени (*Alcoholic Liver Disease, ALD*) – *MetALD* (метаболически ассоциированная алкогольная болезнь печени) для выделения пациентов с потреблением алкоголя больше, чем допустимо для неалкогольного генеза: 140 г/нед для женщин и 210 г/нед и более для мужчин. Термин «алкогольная болезнь печени» подразумевает потребление алкоголя женщинами более 50 г/день и 350 г/нед в пересчете на чистый этанол, мужчинами – более 60 г/день и 420 г/нед [14]. Таким образом, даже в рамках «стеатотической болезни печени» выделяются варианты

заболевания с преобладающим этиологическим фактором – метаболической дисфункцией или алкоголем.

Несмотря на различия в этиологии, в течении и развитии АЖБП и НАЖБП отмечены сходные патогенетические механизмы. Свободные жирные кислоты и этанол оказывают множество эффектов на гепатоциты, определяя возникновение митохондриальной дисфункции, стресса эндоплазматического ретикулама и избыточную продукцию активных форм кислорода, что приводит к гепатоцеллюлярному повреждению, активации других путей гибели клеток и инфламмасом. Измененные гепатоциты высвобождают молекулы молекулярного паттерна, ассоциированного с повреждением (DAMP), внеклеточные везикулы, которые передают сигналы купферовским и звездчатым клеткам печени, определяя развитие воспаления и фиброгенез. И НАЖБП, и АЖБП связаны с дисбиозом кишечника и изменением проницаемости кишечной стенки, что приводит к попаданию бактериальных продуктов (патоген-ассоциированных молекулярных структур (PAMPs), липополисахаридов (ЛПС) и др.) в порталный кровоток. В печени ЛПС и PAMPs могут активировать различные Toll-подобные рецепторы, а также способствовать сборке инфламмасом, определяя усиление воспалительных реакций. Дисфункция жировой ткани, связанная с провоспалительным состоянием, с повышенными уровнями циркулирующих цитокинов (TNF- α , IL-6 и др.) при НАЖБП, провоспалительные цитокины, высвобождаемые макрофагами, при АЖБП могут также активировать рецепторы гибели клеток и индуцировать апоптоз. Наличие перекрывающихся патофизиологических механизмов создает сложности в диагностике данных патологий, т. к. в клинической практике актуально установление наиболее значимого пускового этиологического фактора, поскольку это определяет тактику ведения пациентов, акценты в терапии [15].

Известны специфические эффекты этанола и его метаболитов. Так, исследования *in vitro* продемонстрировали увеличение образования коллагена стеллатными клетками печени под действием ацетальдегида, а также усиление транскрипции генов проколлагена и фибронектина [16]. При алкогольном поражении печени обсуждается ряд прямых и опосредованных эффектов воздействия алкоголя на печень. Среди них – снижение текучести и повышение проницаемости клеточных мембран с нарушением связывания и включения крупных лигандов, транспорта малых лигандов, нарушение функции мембранных ферментов, образование аномальных митохондрий, появление неоантигенов, аномальных фосфолипидов (фосфатидилэтанола). Показаны выраженные токсические влияния ацетальдегида на синтез белков в печени – торможение окислительного дезаминирования аминокислот, ингибирование синтеза альбумина, воздействие на систему печеночных микротрубочек, участвующих во внутриклеточном транспорте и секреции белков. Установлено взаимодействие ацетальдегида с цистеином и/или глутатионом, что вызывает накопление свободных радикалов и активацию перекисного окисления липидов. Стабильные соединения ацетальдегида с гистонами ДНК,

воздействие свободных радикалов на ДНК ассоциированы с апоптозом клеток. Исследованы механизмы влияния этанола на метаболизм ксенобиотиков, нарушения иммунных реакций с образованием антител к неоантигенам, продукцией цитотоксических лимфоцитов. Установлены факторы фиброгенеза, стимуляция канцерогенеза, обусловленные воздействием этанола и его метаболитов [16]. Подобные изменения ассоциированы именно с алкоголем, что определяет ряд отличных от неалкогольной жировой печени факторов патогенеза.

Имеющиеся в распоряжении методы и подходы не позволяют в достаточной степени дифференцировать алкогольную и неалкогольную жировую болезнь печени [16, 17].

Поэтому разработка методов, выявление биомаркеров, позволяющих различить алкогольный и неалкогольный генез жировой болезни печени, продолжает оставаться актуальной. В проведенных ранее исследованиях нами были показаны различия в электрических, вязкоупругих показателях эритроцитов [18, 19], уровнях жирных кислот мембран эритроцитов, сыворотки крови у пациентов с АЖБП и НАЖБП [20, 21]. Это оказалось первым этапом работы по созданию диагностических моделей с использованием данных параметров.

На данном этапе исследования **целью** оказалось создание диагностических панелей, состоящих из электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов, для дифференцирования жировой болезни печени алкогольного и неалкогольного генеза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Под наблюдением оказались мужчины с жировой болезнью печени по данным ультразвукового исследования органов брюшной полости: 38 человек (средний возраст $47,5 \pm 2,9$ года) с НАЖБП, 31 – с АЖБП (средний возраст $45,1 \pm 3,1$ года). Для лиц с алкогольной жировой болезнью печени установлено соответствие патологии кодам K70.0 «Алкогольная жировая дистрофия печени [стеатоз]» и K70.1 «Алкогольный гепатит по МКБ-10»; для мужчин с неалкогольной жировой болезнью печени – коду K76.0 «Жировая дегенерация печени, не классифицированная в других рубриках» [22].

Отсутствие серологических маркеров (метод иммуноферментного анализа) и/или ДНК- и РНК-вирусов (метод полимеразной цепной реакции) позволило исключить вирусный генез заболеваний печени.

Критерии клинических рекомендаций были основанием для верификации неалкогольной жировой болезни печени [23] с подтверждением диагноза НАЖБП индексом NAFLD liver fat score [24]. Пациенты с НАЖБП редко (1–4 раза в год) потребляли низкие дозы алкоголя (в среднем $15,8 \pm 3,9$ г/сут в пересчете на чистый этанол) или не потребляли спиртные напитки вообще. Алкогольный генез патологии печени в данной группе был исключен на основании результатов опросников AUDIT, CAGE, биохимических параметров. У пациентов с НАЖБП обнаружены проявления метаболического синдрома, соответствующие следующим критериям: основной

критерий – абдоминальный тип ожирения, окружность талии более 94 см; дополнительные критерии – артериальное давление $> 130/85$ мм рт. ст. или лечение артериальной гипертензии препаратами; повышение уровня триглицеридов ($\geq 1,7$ ммоль/л); снижение уровня холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП) ($< 1,0$ ммоль/л); повышение содержания ХС липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) $> 3,0$ ммоль/л; концентрация глюкозы плазмы натощак $\geq 6,1$ или $7,8$ ммоль/л через 2 ч после нагрузки глюкозой. Достоверным метаболический синдром считали при наличии трех критериев: одного основного и двух дополнительных [25]. Алкогольный генез стеатоза установлен на основании подтвержденного факта систематического текущего или прошлого потребления алкоголя (по данным стандартного опроса, с использованием опросников CAGE, AUDIT). Преобладающее число пациентов с АЖБП потребляли алкоголь более 3 раз в неделю, преимущественно крепкие алкогольные напитки, разовая доза потребляемого алкоголя составила $124,9 \pm 73,1$ (103 [57; 1500]) г, недельная – $652,9 \pm 433,4$ (560 [395; 700]) г в пересчете на чистый этанол. Исследование крови пациентов проведено на $4,8 \pm 3,7$ день абстиненции, доза алкоголя, выпитого накануне, составила $121,9 \pm 81,2$ (102 [76,8; 133,8]) г. В группе с АЖБП большая часть обследованных имела алкогольный стаж от 8,9 до 22 лет.

Генетически обусловленные патологии, ассоциированные с развитием стеатоза печени, были исключены на основании исследования уровня церулоплазмينا крови (болезнь Вильсона – Коновалова), выявления мутаций гена *SERPINA1* – G264V и G342L (врожденная недостаточность α 1-антитрипсина), мутаций в гене *HFE* (в локусах 187 C $>$ G (H63D) и 845 G $>$ A (C282Y) (гемохроматоз)). Отсутствие антител ANA, SMA и AT-LKM-1 дало возможность исключить аутоиммунный гепатит. Лекарственный анамнез и отмена возможного препарата, влияющего на образование липопротеинов промежуточной плотности, обеспечили исключение лекарственного гепатита. Анамнестически установлено отсутствие длительного (более двух недель) парентерального питания как вероятной причины развития жировой болезни печени.

Обследование пациентов включало определение биохимических параметров, в т. ч. печеночных проб, показателей липидного профиля; подсчет индексов NAFLD liver fat score, Caro. Для определения индекса NAFLD liver fat score использована следующая формула: $\text{NAFLD-LFS} = -2,89 + 1,18 \times (\text{метаболический синдром: да} - 1, \text{ нет} - 0) + 0,45 \times (\text{СД2: да} - 2, \text{ нет} - 0) + 0,15 \times (\text{содержание инсулина, мкЕд/мл}) + 0,04 \times (\text{активность АСТ, Ед/л}) - 0,94 \times \text{АСТ/АЛТ}$ [30]. Индекс Caro рассчитан как соотношение содержания глюкозы (ммоль/л) и инсулина (мкМЕ/мл) в плазме крови натощак [22].

Степень фиброза печени, установленная с помощью метода транзитной эластографии на аппарате FibroScan® 502 (Echosens, Франция) [26], у обследованных обеих групп не превышала первой степени.

У всех мужчин с жировой болезнью печени исследованы электрические и вязкоупругие показатели эритроцитов с использованием метода диэлектрофореза

в неоднородном переменном электрическом поле (НПЭП) с помощью электрооптической системы детекции клеток [27]. В ходе проведения исследования 2 мл тощаковой крови забирали вакутейнерами в 3,7% цитратный буфер в соотношении 9 : 1, затем 9,7–12 мкл крови вносили в 0,3 М раствор сахарозы (рН = 7,36) с коэффициентом k 0,9–1,1 : 29–31 и переносили суспензию исследуемых эритроцитов с концентрацией клеток $1,6–1,8 \times 10^5$ /мкл в измерительную ячейку для проведения измерений. В измерительной ячейке на клетки красной крови воздействовали НПЭП со следующими характеристиками: напряженность электрического поля 10^5 В/м, градиент напряженности электрического поля 10^{11} В/м², частотный диапазон $5 \times 10^4–10^6$ Гц. Изучение параметров эритроцитов осуществляли на четырех частотах электрического поля: 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 и 10^6 Гц.

Оценивали перечень параметров эритроцитов: средний диаметр (м), доли дискоцитов, сфероцитов, деформированных клеток (%), поляризуемость клеток на разных частотах диапазона (м³), относительную поляризуемость (соотношение величины показателя на 10^6 Гц к 10^5 Гц), обобщенные показатели жесткости (Н/м), вязкости (Па × с), электропроводность мембран (См/м), индексы деструкции (на разных частотах диапазона) (%) и агрегации (усл. ед.), амплитуду деформации эритроцитов на частоте 10^6 Гц (м), степень деформации клеток на частоте 5×10^5 Гц (%), емкость мембран эритроцитов (Ф), скорость движения клеток к электродам (мкм/с), положение равновесной частоты (Гц), величину дипольного момента (Кл × м). Пакет оригинальных программ CELLFIND обеспечил распознавание образа клеток и компьютерную обработку полученных данных. Ошибка воспроизводимости метода не превышала 12%.

Статистическая обработка данных выполнена с использованием программы IBM SPSS Statistics (версия 26.0). Определялся характер распределения количественных признаков методом Колмогорова – Смирнова. В случае нормального распределения вычислялось среднее значение (M) и стандартное отклонение (SD). При сравнении двух нормально распределенных выборок использовался t-тест Стьюдента. При отсутствии нормального распределения вычислялись медиана (Me), 25%-ный и 75%-ный процентиля (Me [25%; 75%]), статистическую значимость различий показателей оценивали с помощью непараметрического U-критерия Манна – Уитни, для относительных параметров использован критерий χ^2 Пирсона.

Для выявления электрических, вязкоупругих параметров эритроцитов – потенциальных дифференциально диагностических маркеров жировой болезни печени различной этиологии осуществлена нормализация уровней показателей с последующим проведением дискриминантного анализа на основе ортогонального метода частичных наименьших квадратов (Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis – ortho PLS-DA). Для установления показателей клеток красной крови – возможных кандидатов на дифдиагностические биомаркеры применен непарный (сравнение уровней параметров групп больных попарно) t-тест и метод Volcano plot (система методов машинного

обучения Random Forest) с использованием программного обеспечения MATLAB (R2019a, Math Works) и языка программирования R, стандартных библиотек обучающих классификаций и наборов инструментов статистики [28]. ROC-анализ обеспечил оценку диагностической точности показателей или их комбинаций, претендующих на роль биомаркеров, различающих АЖБП и НАЖБП.

Исследование выполнено при одобрении этическим комитетом ФГБНУ «НИИ терапии и профилактической медицины» (протокол заседания №122 от 29.11.2016 г.). Всеми мужчинами, принявшими участие в исследовании, подписано 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 г. №266.

РЕЗУЛЬТАТЫ

У пациентов изучаемых групп были проанализированы клинико-биохимические характеристики, представленные в *табл. 1*. Мужчины с ЖБП различного генеза не различались по возрасту. Пациенты с НАЖБП отличались от лиц с АЖБП наличием проявлений метаболического синдрома – абдоминальным ожирением, артериальной гипертензией, дислипидемией. У мужчин с неалкогольным генезом ЖБП выявлены более высокие уровни инсулина ($p = 0,004$), мочевой кислоты ($p = 0,003$) по сравнению с группой с АЖБП (*табл. 1*). Наличие инсулинорезистентности в группе с НАЖБП подтверждено значениями индекса Саго менее 0,33 ($p < 0,05$). Величины шкалы содержания жира (NAFLD liver fat score), превышающие 0,64, в этой группе свидетельствовали о наличии стеатоза ($p = 0,002$) [29]. Вместе с тем уровни триглицеридов и ХС ЛПНП имели тенденцию к увеличению при неалкогольном генезе по сравнению с алкогольным. Содержание общего белка и альбумина у пациентов обеих групп сопоставимо, сохранность синтетической функции печени, вероятно, связана с начальными стадиями жировой болезни печени – стеатозом [16].

Активность АСТ, коэффициент Де Ритиса, ГГТП, уровень ХС ЛПВП у пациентов с АЖБП превышали таковые при НАЖБП, подтверждая факт систематического потребления алкоголя, о чем косвенно свидетельствует активность АЛТ в пределах референтных значений для обеих групп, которая более специфична для поражения гепатоцитов [16, 17]. Статистически значимо более высокие уровни общего билирубина, железа сыворотки крови в случаях с алкогольным генезом заболевания по сравнению с неалкогольным, вероятно, отражали более выраженное нарушение проницаемости мембран гепатоцитов и их органелл как проявление синдрома цитолиза при воздействии на клетки печени этанола и его производных [16].

Исследованная с помощью метода непрямой эластометрии эластичность печени в группах с НАЖБП и АЖБП оказалась сопоставимой, что не исключает вероятность

● **Таблица 1.** Клинико-биохимическая характеристика пациентов с жировой болезнью печени неалкогольного и алкогольного генеза (M ± SD)

● **Table 1.** Clinical and biochemical characteristics of patients with fatty liver disease of non-alcoholic and alcoholic genesis (M ± SD)

Показатели	Группа пациентов с НАЖБП, n = 38	Группа пациентов с АЖБП, n = 31	p
Возраст, лет	47,5 ± 2,9	45,1 ± 3,1	>0,1
Систолическое артериальное давление, мм рт. ст.	143,9 ± 3,7	138,1 ± 2,9	>0,1
Диастолическое артериальное давление, мм рт. ст.	88,4 ± 2,9	86,7 ± 3,2	>0,1
Индекс массы тела, кг/м ²	33,8 ± 2,95	26,8 ± 1,98	0,053
Окружность талии, см	114,9 ± 3,8	95,5 ± 2,8	0,0001
Содержание инсулина, мкЕд/мл	34,9 ± 2,85	20,6 ± 3,9	0,004
Содержание общего холестерина, мг/дл	247 ± 8,5	219,2 ± 7,2	0,015
Содержание ХС ЛПВП, мг/дл	38,57 ± 2,8	46,87 ± 2,5	0,03
Содержание ХС ЛПНП, мг/дл	189,9 ± 18,7	145,9 ± 16,8	0,084
Содержание триглицеридов, мг/дл	239,8 ± 17,9	200,4 ± 14,8	0,09
Содержание глюкозы в крови натощак, ммоль/л	6,7 ± 0,8	5,9 ± 0,8	>0,1
Содержание общего белка, г/л	72,7 ± 1,6	70,5 ± 1,5	>0,1
Содержание альбумина, г/л	45,34 ± 0,9	44,32 ± 0,7	>0,1
Активность АЛТ, Ед/л	37,8 ± 4,7	42,2 ± 3,5	>0,1
Активность АСТ, Ед/л	27,5 ± 2,9	54,7 ± 2,9	0,00001
Коэффициент Де Ритиса (АСТ/АЛТ)	0,75 ± 0,05	1,18 ± 0,09	0,00008
Активность гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТП), Ед/л	29,5 ± 2,9	58,9 ± 4,6	0,00001
Активность щелочной фосфатазы, Ед/л	148,9 ± 9,9	163,3 ± 8,8	>0,1
Содержание общего билирубина, мкмоль/л	15,9 ± 0,87	22,8 ± 0,78	0,00001
Содержание прямого билирубина, мкмоль/л	3,9 ± 0,8	5,7 ± 0,7	>0,1
Содержание мочевой кислоты, мг/дл	421,9 ± 11,7	369,4 ± 12,5	0,003
Содержание креатинина, мкмоль/л	78,8 ± 2,9	82,1 ± 2,7	>0,1
Содержание мочевины, ммоль/л	6,4 ± 1,1	6,1 ± 1,3	>0,1
Содержание железа в сыворотке, мкмоль/л	16,92 ± 1,8	23,8 ± 1,6	0,005
Эластичность печени, кПа	5,51 ± 0,9	6,92 ± 0,88	>0,1
Индекс NAFLD liver fat score	2,87 ± 0,47	1,23 ± 0,21	0,002
Индекс Саго	0,22 ± 0,07	0,36 ± 0,03	0,05

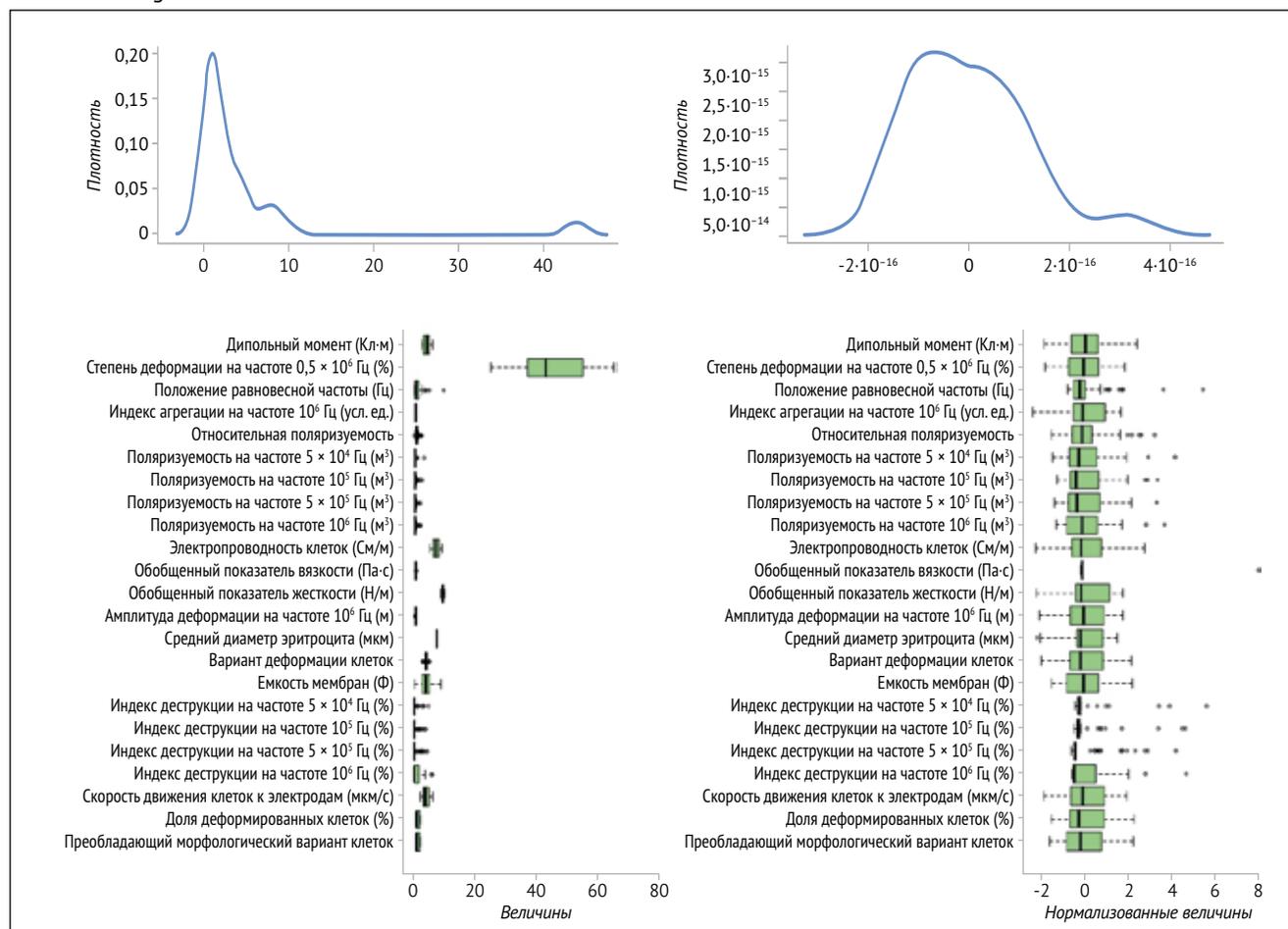
большей выраженности фиброза при АЖБП с учетом применения в группе с НАЖБП датчика XL [30, 31].

Пациентам обеих группы исследованы электрические и вязкоупругие параметры эритроцитов методом диэлектрофореза. В проведенных ранее исследованиях у пациентов с алкогольной жировой болезнью печени были выявлены более высокие доли деформированных клеток, сфероцитов с более низкой способностью к деформации на высоких частотах электрического поля на фоне повышенных уровней обобщенных показателей вязкости, жесткости клеток, с более низким отрицательным поверхностным зарядом, склонных к агрегатообразованию, лизису, с большей электропроводностью, утолщенными

мембранами по сравнению с эритроцитами пациентов с НАЖБП ($p < 0,05$) [18]. Однако оставалось неясным, какие из параметров эритроцитов являются значимыми для дифференцирования АЖБП и НАЖБП, для чего потребовался комплекс методов современной статистической обработки. Для выявления показателей – потенциальных биомаркеров для различения АЖБП и НАЖБП была произведена процедура нормализации их величин (*рис. 1*).

Для выявления наличия совпадающих и отличающихся по уровню характеристик клеток красной крови в нормализованных величинах у пациентов с АЖБП и НАЖБП был произведен дискриминантный анализ на основе ортогонального метода частичных наименьших

● **Рисунок 1.** Нормализация значений электрических и вязкоупругих параметров эритроцитов в группах пациентов с ЖБП алкогольного и неалкогольного генеза
 ● **Figure 1.** Normalization of the electrical and viscoelastic values of erythrocytes in groups of patients with FLD of alcoholic and non-alcoholic genesis



Слева – значения параметров до нормализации, справа – после нормализации

квадратов (ortho PLS-DA), позволивший установить наличие показателей эритроцитов, по уровню которых группы различались (рис. 2).

Применение метода Volcano plot (непарная статистика) позволило установить перечень электрических, вязкоупругих показателей эритроцитов, оказавшихся наиболее значимыми для дифференцирования пациентов с алкогольной и неалкогольной этиологией жировой болезни печени (табл. 2).

Исходя из данных таблицы наиболее значимыми для различия ЖБП различного генеза оказались емкость клеточной мембраны ($p = 1,21E-11$), степень изменения амплитуды деформации эритроцитов на частоте 5×10^5 Гц ($p = 2,38E-08$), поляризуемость клеток на частоте 10^6 Гц ($p = 9,38E-08$), скорость движения клеток к электродам ($p = 4,32E-06$), величина дипольного момента ($p = 1,66E-05$), относительная поляризуемость ($p = 2,35E-05$), уровни которых были выше у пациентов с НАЖБП по сравнению с АЖБП. Напротив, индекс деформации эритроцитов на частоте 5×10^5 Гц оказался выше в группе с АЖБП, чем с НАЖБП ($p = 0,016$), а равновесная частота была сдвинута в высокочастотный диапазон при алкогольном генезе по сравнению с НАЖБП ($p = 2,13E-06$).

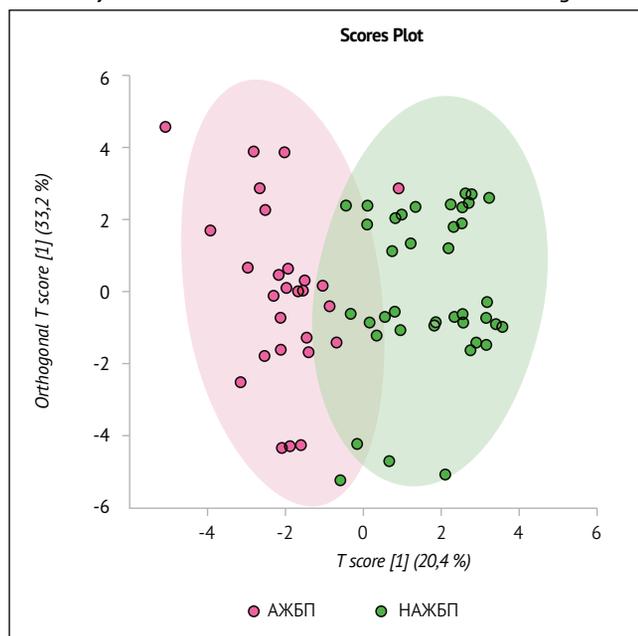
Ранжирование исследованных параметров эритроцитов по их вкладу в различие жировой болезни печени алкогольного и неалкогольного генеза представлено на рис. 3.

При проведении ROC-анализа даже величины отдельных параметров эритроцитов продемонстрировали высокие уровни диагностической точности при дифференцировании НАЖБП и АЖБП (рис. 4). Так, положение равновесной частоты обеспечило чувствительность 87,2%, специфичность 92,6% (AUC 0,967); емкость мембран эритроцитов: чувствительность 92,3%, специфичность 92,6% (AUC 0,943); поляризуемость клеток на частоте 10^6 Гц: чувствительность 92,3%, специфичность 77,8% (AUC 0,896).

На рис. 5 представлены модели, включающие в себя различные электрические и вязкоупругие параметры эритроцитов (от 2 до 23 показателей эритроцитов в составе одной модели) со значениями AUC от 0,913 до 0,975 (рис. 5А). При этом включение в модель большего количества параметров не приводило к существенному увеличению диагностической точности в различении АЖБП и НАЖБП. Оптимальной оказалась модель, состоящая из пяти параметров: положение равновесной

● **Рисунок 2.** Дискриминантный анализ на основе ортогонального метода частичных наименьших квадратов (ortho PLS-DA) для выявления различающихся уровней электрических, вязкоупругих параметров эритроцитов пациентов с ЖБП алкогольного и неалкогольного генеза

● **Figure 2.** Discriminant analysis based on orthogonal partial least squares (ortho PLS-DA) to identify different levels of electrical, viscoelastic parameters of red blood cells of patients with fatty liver disease of alcoholic and non-alcoholic genesis



Розовое облако, красные точки – уровни параметров эритроцитов в группе АЖБП, зеленое облако, зеленые точки – в группе пациентов с НАЖБП

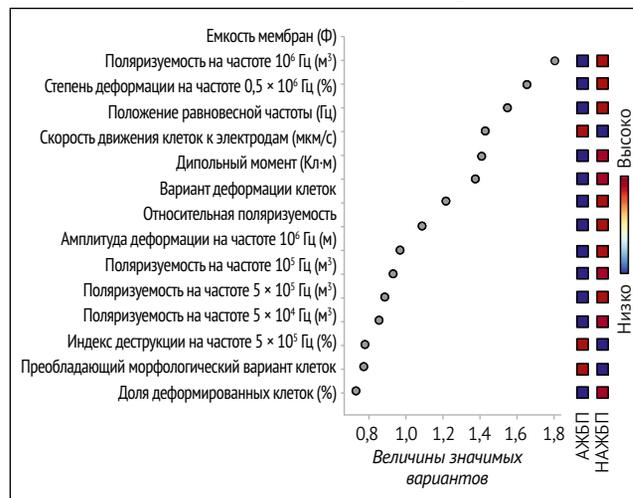
● **Таблица 2.** Электрические и вязкоупругие параметры эритроцитов – потенциальные маркеры для дифференцирования НАЖБП и АЖБП (Volcano plot, непарная статистика)

● **Table 2.** Electrical and viscoelastic parameters of erythrocytes – potential markers for differentiating NAFLD and AFLD (Volcano plot, unpaired statistics)

Электрические и вязкоупругие параметры эритроцитов	Кратность изменений (FC)	log2(FC)	Значения p	-log10(p)
Емкость клеточной мембраны, Ф	2,9469	1,5592	1,21E-11	10,919
Степень изменения амплитуды деформации на частоте $0,5 \times 10^6$ Гц, %	1,7334	0,79357	2,34E-08	7,6304
Поляризуемость на частоте 10^5 Гц, M^2	2,3093	1,2074	9,38E-08	7,0279
Положение равновесной частоты, Гц	0,26012	-1,9428	2,13E-06	5,6718
Скорость движения E_r к электродам, мкм/с	1,5737	0,65416	4,32E-06	5,3641
Дипольный момент, Кл × м	1,5028	0,58767	1,66E-05	4,7807
Относительная поляризуемость	1,8131	0,85847	2,35E-05	4,628
Индекс деструкции на частоте 5×10^5 Гц, %	0,454	-1,1392	0,016564	1,7808

● **Рисунок 3.** Ранжирование электрических, вязкоупругих параметров эритроцитов по их вкладу в различие ЖБП алкогольного и неалкогольного генеза

● **Figure 3.** Ranking of electrical, viscoelastic parameters of erythrocytes by their contribution to distinguishing fatty liver disease of alcoholic and non-alcoholic genesis

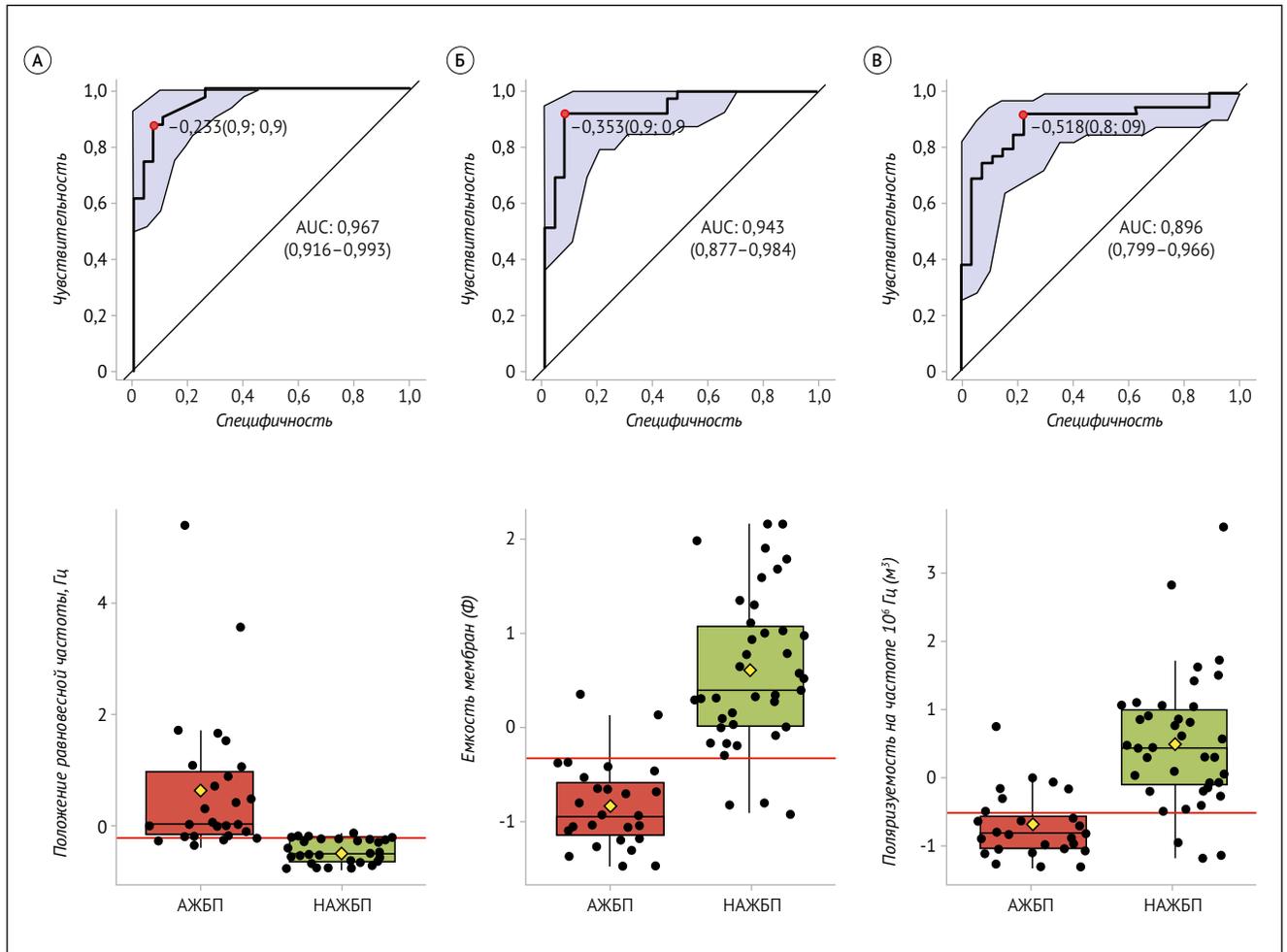


частоты, поляризуемость клеток на частоте 10^6 Гц, электропроводность клеток, емкость мембран и степень изменения амплитуды деформации на частоте 5×10^5 Гц, которая при небольшом перечне параметров эритроцитов обеспечила AUC 0,975 с чувствительностью 96,3%, специфичностью 91,8% (рис. 5B).

ОБСУЖДЕНИЕ

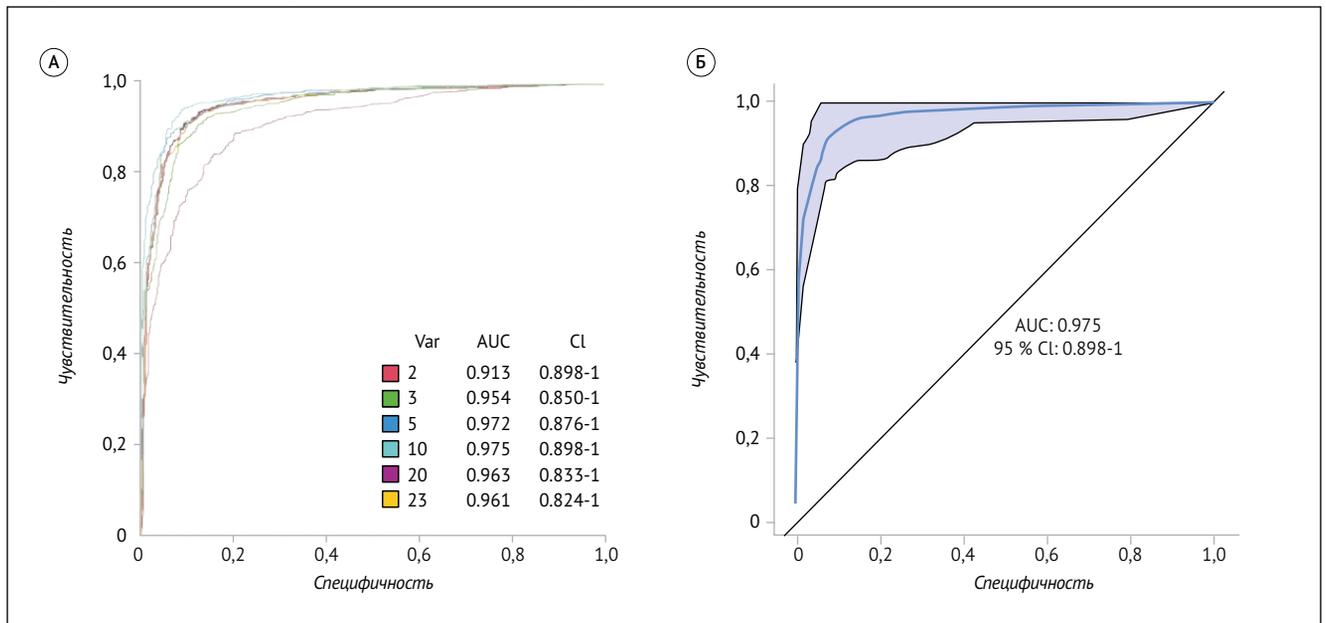
Использование эритроцитов как объекта исследования в настоящей работе определяется их доступностью, способностью в короткие сроки реагировать на внешние и внутренние воздействия; состояние мембран эритроцитов является своеобразным зеркалом состояния мембран клеток других тканей и органов. В проведенных нами ранее исследованиях [18, 19, 27] у пациентов с жировой болезнью печени удалось выявить особенности электрических, вязкоупругих показателей клеток красной крови по сравнению со здоровыми лицами, а также в связи с этиологией заболевания. Однако для выявления параметров из числа показателей эритроцитов, определенных с помощью метода диэлектрофореза, которые могут служить биомаркерами для дифференцирования АЖБП и НАЖБП, потребовался комплекс современных методов статистического анализа – система методов машинного обучения Random Forest, в т. ч. дискриминантный анализ (ortho PLS-DA), Volcano plot, ROC-анализ. Использование данных подходов после нормализации значений параметров эритроцитов обеспечило установление как самых значимых показателей, так и степени их вклада в различие между группами АЖБП и НАЖБП, вероятного влияния на другие характеристики эритроцитов. Таким образом, удалось выявить ключевые параметры эритроцитов для дифференцирования алкогольного и неалкогольного генеза жировой болезни печени. Создание перечня моделей, включающих разное число параметров эритроцитов, обеспечило

● **Рисунок 4.** ROC-кривые и диаграммы размаха («ящик с усами») (A)
 ● **Figure 4.** ROC curves and range diagrams (“box with whiskers”) (B)



Границами ящика служат первый и третий квартили, линия в середине ящика – медиана значений положения равновесной частоты (А), емкости мембран (Б), поляризуемости клеток на частоте 10⁶ Гц (В) при дифференцировании АЖБП и НАЖБП

● **Рисунок 5.** ROC-кривые при использовании комбинированных моделей
 ● **Figure 5.** ROC curves using combined models including



А – 2 – два параметра, 3 – три параметра, 5 – пять параметров, 10 – десять параметров, 20 – двадцать параметров, 23 – двадцать три параметра; Б – оптимальная комбинированная модель, включающая пять параметров эритроцитов (положение равновесной частоты, поляризуемость клеток на частоте 10⁶ Гц, электропроводность клеток, емкость мембран, степень изменения амплитуды деформации на частоте 5 x 10⁵ Гц)

создание оптимальной модели с минимальным числом вариантов при максимальной диагностической точности.

Наиболее значимыми параметрами эритроцитов для дифференцирования алкогольной и неалкогольной этиологии жировой болезни печени оказались характеристики, связанные с величиной поверхностного заряда клеток красной крови (дипольный момент, скорость движения клеток к электродам, положение равновесной частоты), с биологической активностью, резистентностью клеток (поляризуемость, индекс деструкции эритроцитов), структурой мембран эритроцитов (емкость, электропроводность) и деформируемостью клеток. Следует заметить, что более выраженные сдвиги в электрических и вязкоупругих параметрах эритроцитов выявлены у пациентов с АЖБП по сравнению с НАЖБП.

Значимость уровня поверхностного заряда эритроцитов, отражаемая величиной дипольного момента, скоростью движения клеток к электродам, положением равновесной частоты и тесно связанная с зарядом структурной стойкости клеток (поляризуемость, индекс деструкции) для различения АЖБП и НАЖБП, неслучайна. Известно, что величина поверхностного заряда эритроцитов (ζ -потенциала) обусловлена состоянием их мембран, в первую очередь уровнем сиаловых (нейраминовых) кислот [32]. В области взаимодействия этанола, ацетальдегида с полярными группами фосфолипидов происходит снижение уровня гликанов, связанных с мембранами, что изменяет их наружную поверхность, приводя к снижению поверхностного отрицательного заряда клеток [33]. С сиаловыми кислотами, входящими в состав гликопротеинов мембран эритроцитов, связывают длительность циркуляции клеток в крови, подверженность свободнорадикальному окислению, резистентность. В экспериментах процесс удаления с поверхности клеток красной крови сиаловых кислот был ассоциирован со снижением деформабельности и увеличением склонности клеток к адгезии [34, 35]. Связь структуры гликанов с функцией Na^+ , K^+ -АТФазы мембран эритроцитов является существенным фактором изменения активности фермента при систематическом потреблении алкоголя [36]. Снижение активности Na^+ , K^+ -АТФазы при хроническом воздействии алкоголя связано как с непосредственным воздействием этанола, его производных на структуру фермента, с опосредованным изменением его липидного микроокружения, так и вследствие измененного углеводного состава гликопротеидов, гликолипидов мембран [37].

Снижение АТФ-азной активности ассоциировано с нарушением ионного мембранного транспорта, что сказывается на величине заряда мембран эритроцитов. По данным литературы, трансмембранный потенциал обусловлен разницей в электрическом градиенте, возникающей между зарядами внутренней и внешней стороны мембраны, связанными с концентрациями электролитов [38, 39]. Под влиянием этанола происходит блокада работы кальциевого насоса клеток красной крови и, как следствие, увеличение внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} , что ассоциировано со снижением электрокинетического потенциала [40]. Показано, что модификация мембран под

действием кальция приводит к его избыточному поступлению в цитоплазму, что активирует мембранные каналы калиевой проводимости, сказываясь на величине ζ -потенциала. Другим эффектом избыточных уровней кальция является повышенная агрегация молекул белка цитоскелета – спектрина [41], что ассоциировано со снижением способности к деформации клеток. В ряде работ предположили возможность участия ζ -потенциала в регуляции конформационных переходов белков эритроцитов и, таким образом, транспорта кислорода [38, 39].

Уровень ζ -потенциала эритроцитов зависит не только от измененного состава метаболитов клетки, но и от количественных и качественных сдвигов компонентов суспензионной среды (плазмы) [42, 43]. Известно, что адсорбция глобулинов на поверхности мембран эритроцитов происходит независимо от их антигенной структуры, что приводит к значительному снижению электрофоретической подвижности эритроцитов [38]. Адсорбция на поверхности клеток красной крови плазменных белков (фибрина, фибриногена и др.) снижает отрицательный заряд эритроцитов, следствием чего является их повышенная агрегация и адгезия [42].

Вышеописанное определяет значимость электрических параметров эритроцитов, связанных с поверхностным отрицательным зарядом клеток: дипольного момента, скорости движения клеток к электродам, положения равновесной частоты для различения АЖБП и НАЖБП. Поскольку заряд и структура мембран эритроцитов тесно связаны с их биологической активностью и резистентностью, неслучайна роль поляризуемости клеток как биомаркера в дифференциальной диагностике. Поляризуемость определяют как способность атомов, ионов, молекул вещества смещаться в электрическом поле E относительно положения равновесия. Данный показатель тесно связан со структурной целостностью и биологической активностью эритроцита. Относительная поляризуемость отражает адаптационные возможности клеток красной крови [27]. Большая степень снижения данного показателя у пациентов с АЖБП по сравнению с НАЖБП, вероятно, обусловлена эффектами воздействия этанола, как и большая степень гемолиза клеток на частоте 5×10^5 Гц, что согласуется с результатами исследования S. Bulle et al. [44].

Молекулярные механизмы повреждения мембран эритроцитов под влиянием алкоголя включают снижение текучести и повышение их проницаемости (увеличение относительного содержания холестерина при снижении уровня легкоокисляемых фосфолипидов на фоне возрастания их лизофракций, увеличение уровней насыщенных жирных кислот, омега-6 полиненасыщенных на фоне снижения омега-3 ПНЖК в составе фосфолипидов мембран), нарушение функций мембраносвязанных ферментов, в т. ч. в связи с образованием аддуктов белков с этанолом, ацетальдегидом, с изменением антигенных свойств мембран [16, 33, 45, 46]. Повышенный уровень аддуктов этанола, ацетальдегида с гемоглобином ассоциирован с увеличением его внутриэритроцитарной вязкости, обобщенной жесткости клетки, снижением ее способности к деформации. Дефицит восстановленного

глутатиона при воздействии активных форм кислорода приводит к образованию спектрин-гемоглибиновых ассоциатов, отмечено усиление окисления гемоглобина [47]. При хроническом потреблении алкоголя выявлено образование «сшивок» между гемоглибином, продуктами его катаболизма с белками мембраны эритроцитов, что усиливает ее структурно-функциональные нарушения [46] и, вероятно, сказывается на снижении способности к деформации клеток.

Структурные сдвиги в мембранах эритроцитов у пациентов с АЖБП ассоциированы с изменениями их емкости и способности проводить электрический ток, что определяет значимость данных показателей для дифференциально-диагностических целей [27].

Из данных литературы известно, что способность эритроцита к деформации определяется рядом факторов: жидкой консистенцией содержимого клетки, эластичностью мембраны эритроцита, относительным избытком площади мембраны по отношению к внутриэритроцитарному объему и состоянием гемоглобина [48]. Изменения структуры мембран, внутреннего содержимого клеток красной крови на фоне систематического потребления алкоголя, несомненно, сказываются на деформативности клеток, определяя значимость параметра – степень изменения амплитуды деформации на частоте 5×10^5 Гц для различения АЖБП и НАЖБП. Существенные сдвиги в уровне деформируемости эритроцитов под влиянием хронического воздействия этанола согласуются с результатами перечня недавних исследований [49–52].

В ряде работ последнего десятилетия выявлены изменения структурно-функциональных показателей эритроцитов у пациентов с НАЖБП. Так, В. Arendt et al. обнаружили более низкое мембранное отношение фосфатидилхолина к фосфатидилэтаноламину у пациентов с НАЖБП по сравнению со здоровыми, что коррелировало с составом мембран гепатоцитов [53] и оказалось ассоциированным с целостностью мембран [54]. Данное обстоятельство может быть связано со сниженными уровнями поляризуемости эритроцитов при НАЖБП и склонностью к лизису клеток. Предполагается, что на соотношение фосфатидилхолин/фосфатидилэтаноламин в эритроцитах может влиять системное воспаление, которое приводит к селективному гидролизу фосфатидилхолина в мембране эритроцитов [55], это указывает на наличие провоспалительных молекул в крови. По данным Е. Straface et al., экстернализация фосфатидилсерина на поверхности эритроцитов представляет собой специфичный для мужчин биомаркер метаболического синдрома и НАЖБП как его проявления [56], что ассоциировано с ускоренным старением эритроцитов, снижением поверхностного заряда клеток и повышением тромбогенного потенциала [57].

Рядом исследователей были выявлены изменения в концентрациях и соотношениях жирных кислот в мембранах эритроцитов пациентов с НАЖБП, причем данные А. Elizondo et al. показали сопоставимость жирно-кислотных профилей мембран эритроцитов и гепатоцитов у пациентов с ожирением [58]. М. Notarnicola et al. установили низкий уровень соотношения

стеариновой кислоты к олеиновой в мембранах эритроцитов пациентов с НАЖБП по сравнению с лицами без НАЖБП [59]. В другой работе установлена корреляция между содержанием омега-3 полиненасыщенных жирных кислот в мембранах эритроцитов и жировым индексом печени (FLI), однако только у пожилых женщин [60]. Неоднозначные результаты, ассоциированные с полом, были получены В. Amirkalali et al. [61]. По данным авторов, омега-3 ПНЖК коррелировали с уровнями IL-6 у мужчин и TNF- α у женщин. Более ранние результаты свидетельствовали, что уровни пальмитолеиновой кислоты 16:1n7 в мембранах эритроцитов были связаны с FLI и активностью ГГТП у всех пациентов и с активностью АЛТ только у мужчин. Кроме того, активность ГГТП у мужчин коррелировала с содержанием 16:1n9 и 18:1n7 в мембранах эритроцитов [62]. Наблюдаемые сдвиги в жирно-кислотных профилях мембран эритроцитов ассоциированы с их физико-химическими свойствами и, как следствие, с изменением способности клеток к деформации [48]. У пациентов с НАЖБП обнаружены изменения внутреннего содержимого эритроцитов, что, вероятно, сказывается на их деформативности. Так, показано, что наличие НАЖБП коррелирует с уровнем гликозилированного гемоглобина [63], причем эта связь наблюдается даже при отсутствии сахарного диабета [64]. Биоинформатический анализ показал, что HbA1c может активно участвовать в патогенетических механизмах прогрессирования НАЖБП путем активации рецептора конечных продуктов гликирования (RAGE), индуцирования гипоксии и подавления высвобождения оксида азота, что связано со сниженной деформируемостью клеток [65]. Наличие резистентности к инсулину у пациентов с НАЖБП сказывается на функциональных параметрах эритроцитов: показано влияние С-пептида проинсулина у пациентов с сахарным диабетом на деформируемость эритроцитов, изменение формы клеток, опосредованное воздействием на Na^+ , K^+ -АТФазу мембран [66].

Подводя итоги, можно заключить, что структурно-функциональные параметры эритроцитов пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени также существенно изменены, тем не менее сдвиги уровней электрических, вязкоупругих характеристик клеток красной крови у пациентов с АЖБП оказались более выраженными, чем при НАЖБП, что и послужило основой создания дифференциально-диагностической модели.

Выводы

Таким образом, систематическое воздействие алкоголя существенно модифицирует структуру мембран клеток, приводя к снижению поверхностного заряда, барьерной функции мембран, снижая резистентность клеток и их способность к деформации, что обуславливает ключевую роль выявленных электрических, вязкоупругих параметров эритроцитов в дифференцировании АЖБП и НАЖБП.

Применение метода диэлектрофореза с последующим использованием системы методов машинного обучения Random Forest позволило установить электрические,

вязкоупругие показатели клеток красной крови, являющиеся биомаркерами для различения алкогольной и неалкогольной жировой болезни печени: емкость клеточной мембраны ($p = 1,21E-11$), степень изменения амплитуды деформации эритроцитов на частоте 5×10^5 Гц ($p = 2,38E-08$), поляризуемость клеток на частоте 10^6 Гц ($p = 9,38E-08$), скорость движения клеток к электродам ($p = 4,32E-06$), величина дипольного момента ($p = 1,66E-05$), относительная поляризуемость ($p = 2,35E-05$), индекс деструкции эритроцитов на частоте 5×10^5 Гц ($p = 0,016$), положение равновесной частоты ($p = 2,13E-06$).

Диагностическая модель, включающая пять параметров: положение равновесной частоты, поляризуемость клеток на частоте 10^6 Гц, электропроводность клеток, емкость мембран и степень изменения амплитуды деформации на частоте 5×10^5 Гц, обеспечила наиболее высокую диагностическую точность с AUC 0,975 с чувствительностью 96,3%, специфичностью 91,8% при дифференцировании АЖБП и НАЖБП.



Поступила / Received 25.08.2024

Поступила после рецензирования / Revised 12.09.2024

Принята в печать / Accepted 14.09.2024

Список литературы / References

- Chalasan N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology*. 2012;55(6):2005–2023. <http://doi.org/10.1002/hep.25762>.
- Younossi Z, Henry L. Contribution of Alcohol and Nonalcoholic Fatty Liver Disease to the Burden of Liver-Related Morbidity and Mortality. *Gastroenterology*. 2016;150(8):1778–1785. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.03.005>.
- Paik JM, Golabi P, Biswas R, Alqahtani S, Venkatesan C, Younossi ZM. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Alcohol Liver Disease are Major Drivers of Liver Mortality in the United States. *Hepatology*. 2020;4(6):890–903. <http://doi.org/10.1002/hep.4.1510>.
- European Association for the Study of the Liver (EASL); European Association for the Study of Diabetes (EASD); European Association for the Study of Obesity (EASO). EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2016;64(6):1388–402. <http://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.11.004>.
- Bedossa P. Pathology of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int*. 2017;37(Suppl. 1):85–89. <http://doi.org/10.1111/liv.13301>.
- Cotter TG, Rinella M. Nonalcoholic Fatty Liver Disease 2020: The State of the Disease. *Gastroenterology*. 2020;158(7):1851–1864. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.01.052>.
- Targher G, Byrne CD, Tilg H. NAFLD and increased risk of cardiovascular disease: clinical associations, pathophysiological mechanisms and pharmacological implications. *Gut*. 2020;69(9):1691–1705. <http://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-320622>.
- Ekstedt M, Franzén LE, Mathiesen UL, Thorelius L, Holmqvist M, Bodemar G et al. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology*. 2006;44(4):865–873. <http://doi.org/10.1002/hep.21527>.
- Musso G, Gambino R, Tabibian JH, Ekstedt M, Kechagias S, Hamaguchi M et al. Association of non-alcoholic fatty liver disease with chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Med*. 2014;11(7):e1001680. <http://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001680>.
- Arab JP, Roblero JP, Altamirano J, Bessone F, Chaves Araujo R, Higuera-De la Tijera F et al. Alcohol-related liver disease: Clinical practice guidelines by the Latin American Association for the Study of the Liver (ALEH). *Ann Hepatol*. 2019;18(3):518–535. <http://doi.org/10.1016/j.aohep.2019.04.005>.
- Frazier TH, Stocker AM, Kershner NA, Marsano LS, McClain CJ. Treatment of alcoholic liver disease. *Therap Adv Gastroenterol*. 2011;4(1):63–81. <http://doi.org/10.1177/17756283X10378925>.
- Singal AK, Bataller R, Ahn J, Kamath PS, Shah VH. ACG Clinical Guideline: Alcoholic Liver Disease. *Am J Gastroenterol*. 2018;113(2):175–194. <http://doi.org/10.1038/ajg.2017.469>.
- Jia Y, Ji P, Nguyen L, French B, Tillman B, French S. Different Roles of Epigenetic Regulators and Inflammation in Hepatocellular Carcinoma Tumorigenesis in Patients with ASH vs. NASH. *Experimental Biology*. 2019;A67:662–667. <http://doi.org/10.31487/j.COR.2019.03.04>.
- Rinella ME, Lazarus JV, Ratziu V, Francque SM, Sanyal AJ, Kanwal F et al. NAFLD Nomenclature consensus group. A multisociety Delphi consensus statement on new fatty liver disease nomenclature. *Ann Hepatol*. 2024;29(1):101133. <http://doi.org/10.1016/j.aohep.2023.101133>.
- Idalzoaga F, Kulkarni AV, Mousa OY, Arrese M, Arab JP. Non-alcoholic Fatty Liver Disease and Alcohol-Related Liver Disease: Two Intertwined Entities. *Front Med (Lausanne)*. 2020;7:448. <http://doi.org/10.3389/fmed.2020.00448>.
- Подымова СД. *Болезни печени*. Изд. 5-е, перераб. и доп. М.: Медицинское информационное агентство; 2018. 984 с.
- Радченко ВГ, Шабров АВ, Зиновьева ЕН, Ситкин СИ. *Заболевания печени и желчевыводящих путей*. СПб.: Спец Лит; 2011. 560 с. Режим доступа: <https://speclit.ru/image/catalog/978-5-299-00348-2/978-5-299-00348-2.pdf>.
- Кручинина МВ, Паруликова МВ, Курилович СА, Громов АА, Генералов ВМ, Кручинин ВН и др. Возможности метода диэлектрофореза эритроцитов в дифференцировании жировой болезни печени алкогольного и неалкогольного генеза у мужчин. *Атеросклероз*. 2020;16(4):27–42. <http://doi.org/10.15372/ATER20200404>.
- Kruchinina MV, Parulikova MV, Kurilovich SA, Gromov AA, Generalov VM, Kruchinin VN et al. Possibilities of the erythrocyte dielectrophoresis method in differentiating fatty liver disease of alcoholic and non-alcoholic origin in men. *Atherosclerosis*. 2020;16(4):27–42. (In Russ.) <http://doi.org/10.15372/ATER20200404>.
- Кручинина МВ, Паруликова МВ, Громов АА, Генералов ВМ, Генералов ВМ, Кручинин ВН и др. Острое воздействие этанола на эритроциты in vitro: новый подход к дифференциальной диагностике жировой болезни печени. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2019;172(12):122–134. <http://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-172-12-122-134>.
- Kruchinina MV, Parulikova MV, Gromov AA, Generalov VM, Generalov KV, Kruchinin VN et al. Acute effects of ethanol on erythrocytes in vitro: a new approach to the differential diagnosis of fatty liver disease. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2019;172(12):122–134. (In Russ.) <http://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-172-12-122-134>.
- Кручинина МВ, Паруликова МВ, Першина НЕ, Кручинина ЭВ. Жирные кислоты мембран эритроцитов как биомаркеры неалкогольной жировой болезни печени у мужчин. *Атеросклероз*. 2022;18(4):362–380. <http://doi.org/10.52727/2078-256X-2022-18-4-362-380>.
- Kruchinina MV, Parulikova MV, Pershina NE, Kruchinina EV. Fatty acids of erythrocyte membranes as biomarkers of non-alcoholic fatty liver disease in men. *Atherosclerosis*. 2022;18(4):362–380. (In Russ.) <http://doi.org/10.52727/2078-256X-2022-18-4-362-380>.
- 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):146–158. <http://doi.org/10.21518/ms2023-391>.
- 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 origin. *Meditsinskiy Sovet*. 2023;17(18):146–158. (In Russ.) <http://doi.org/10.21518/ms2023-391>.
- Ивашкин ВТ, Маевская МВ, Жаркова МС, Котовская ЮВ, Ткачева ОН, Трошина ЕА и др. Клинические рекомендации Российского общества по изучению печени, Российской гастроэнтерологической ассоциации, Российской ассоциации эндокринологов, Российской ассоциации геронтологов и гериатров и Национального общества профилактической кардиологии по диагностике и лечению неалкогольной жировой болезни печени. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2022;32(4):104–140. <https://doi.org/10.22416/1382-4376-2022-32-4-104-140>.
- Ivashkin VT, Maevskaya MV, Zharkova MS, Kotovskaya YuV, Tkacheva ON, Troshina EA et al. Clinical Practice Guidelines of the Russian Scientific Liver Society, Russian Gastroenterological Association, Russian Association of Endocrinologists, Russian Association of Gerontologists and Geriatricians and National Society for Preventive Cardiology on Diagnosis and Treatment of Non-Alcoholic Liver Disease. *Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology*. 2022;32(4):104–140. (In Russ.) <https://doi.org/10.22416/1382-4376-2022-32-4-104-140>.
- Лазебник ЛБ, Голованова ЕВ, Туркина СВ, Райхельсон КЛ, Оковитый СВ, Драпкина ОМ и др. Неалкогольная жировая болезнь печени у взрослых: клиника, диагностика, лечение. Рекомендации для терапевтов, третья версия. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2021;1(1):4–52. <http://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-185-1-4-52>.
- Lazebnik LB, Golovanova EV, Turkina SV, Raikhelson KL, Okovityy SV, Drapkina OM et al. Non-alcoholic fatty liver disease in adults: clinic, diagnostics, treatment. Guidelines for therapists, third version. *Experimental*

- and *Clinical Gastroenterology*. 2021;1(1):4–52. (In Russ.) <https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-185-1-4-52>.
24. Khang AR, Lee HW, Yi D, Kang YH, Son SM. The fatty liver index, a simple and useful predictor of metabolic syndrome: analysis of the Korea National Health and Nutrition Examination Survey 2010–2011. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2019;12:181–190. <http://doi.org/10.2147/DMSO.S189544>.
 25. Рекомендации экспертов Всероссийского научного общества кардиологов по диагностике и лечению метаболического синдрома (2-й пересмотр). *Практическая медицина*. 2010;(5):81–101. Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/rekomendatsii-ekspertov-vserossiyskogo-nauchnogo-obschestva-kardiologov-po-diagnostike-i-lecheniyu-metabolicheskogo-sindroma-vtoroy-17ysclid=m152npv4fe619707186>. Recommendations of experts of the All-Russian Scientific Society of Cardiologists on the diagnosis and treatment of metabolic syndrome (2nd revision). *Practical Medicine*. 2010;(5):81–101. (In Russ.) Available at: <https://cyberleninka.ru/article/n/rekomendatsii-ekspertov-vserossiyskogo-nauchnogo-obschestva-kardiologov-po-diagnostike-i-lecheniyu-metabolicheskogo-sindroma-vtoroy-17ysclid=m152npv4fe619707186>.
 26. Dietrich CF, Vamber 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). *Ultraschall Med*. 2017;38(4):e16–e47. <http://doi.org/10.1055/s-0043-103952>.
 27. Генералов КВ, Кручинина МВ, Сафатов АС, Генералов ВМ, Буряк ГА, Громов АА и др. *Диэлектрофорез в медицине*. Новосибирск: Офсет-ТМ; 2024. 200 с.
 28. Breiman L. Random Forests. *Machine Learning*. 2001;45:5–32. <http://doi.org/10.1023/A:1010933404324>.
 29. Fedchuk L, Nascimbeni F, Pais R, Charlotte F, Housset C, Ratzju V. LIDO Study Group. Performance and limitations of steatosis biomarkers in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2014;40(10):1209–1222. <http://doi.org/10.1111/apt.12963>.
 30. EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. Clinical Practice Guidelines. *J Hepatology*. 2016;64(6):1388–1402. <http://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.11.004>.
 31. Zhang X, Wong GL, Wong VW. Application of transient elastography in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Mol Hepatol*. 2020;26(2):128–141. <http://doi.org/10.3350/cmh.2019.0001n>.
 32. Cheeseman J, Kuhnle G, Spencer DIR, Osborn HMI. Assays for the identification and quantification of sialic acids: Challenges, opportunities and future perspectives. *Bioorg Med Chem*. 2021;30:115882. <http://doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115882>.
 33. Dobrzynska I, Szachowicz-Petelska B, Skrzydlewska E, Figaszewski ZA. Changes in electric charge and phospholipids composition in erythrocyte membrane of ethanol-poisoned rats after administration of teas. *Acta Pol Pharm*. 2004;61(6):483–487. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15794343>.
 34. Piagnerelli M, Zouaoui Boudjeltia K, Vanhaeverbeek M. Red Blood Cell Desialylation in Critically Ill Patients: An Underestimated Cause of Anemia. In: Vincent JL (ed.). *Intensive Care Medicine*. Springer, New York, NY; 2006, pp. 297–305. http://doi.org/10.1007/0-387-35096-9_28.
 35. Mehdi MM, Singh P, Rizvi SI. Erythrocyte sialic acid content during aging in humans: correlation with markers of oxidative stress. *Dis Markers*. 2012;32(3):179–186. <http://doi.org/10.3233/DMA-2011-0871>.
 36. Radosinska J, Vrbjar N. Erythrocyte Deformability and Na, K-ATPase Activity in Various Pathophysiological Situations and Their Protection by Selected Nutritional Antioxidants in Humans. *Int J Mol Sci*. 2021;22(21):11924. <http://doi.org/10.3390/ijms222111924>.
 37. Petelska AD, Szeremeta M, Kotyńska J, Niemcunowicz-Janica A. Experimental and Theoretical Approaches to Describing Interactions in Natural Cell Membranes Occurring as a Result of Fatal Alcohol Poisoning. *Membranes (Basel)*. 2021;11(3):189. <http://doi.org/10.3390/membranes11030189>.
 38. Наточин ЮВ (ред.). *Патофизиология крови*. СПб.: «Издательство БИНОМ» – «Невский диалог»; 2000.
 39. Chen X, Huang Y, Liu W, Yuan Z. Membrane surface charge and morphological and mechanical properties of young and old erythrocytes. *Current Applied Physics*. 2007;7(1):e94–e96. <http://doi.org/10.1016/j.cap.2006.11.024>.
 40. Muravov A, Tikhomirova I. Role Ca(2+) in mechanisms of the red blood cells microrheological changes. *Adv Exp Med Biol*. 2012;740:1017–1038. http://doi.org/10.1007/978-94-007-2888-2_47.
 41. Новицкий ВВ, Рязанцева НВ, Степанова ЕА. *Физиология и патофизиология эритроцита*. Томск: Изд-во ТГУ; 2004. 202 с.
 42. Fernandes HP, Cesar CL, Barjas-Castro Mde L. Electrical properties of the red blood cell membrane and immunohematological investigation. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2011;33(4):297–301. <http://doi.org/10.5581/1516-8484.20110080>.
 43. Tyulina OV, Prokopenko VD, Boldyrev AA, Johnson P. Erythrocyte and plasma protein modification in alcoholism: a possible role of acetaldehyde. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1762(5):558–563. <http://doi.org/10.1016/j.bbadis.2006.03.003>.
 44. Bulle S, Reddy VD, Padmavathi P, Maturu P, Puvvada PK, Nallanchakravarthula V. Association between alcohol-induced erythrocyte membrane alterations and hemolysis in chronic alcoholic. *J Clin Biochem Nutr*. 2017;60(1):63–69. <http://doi.org/10.3164/jcbn.16-16>.
 45. Patra M, Salonen E, Terama E, Vattulainen I, Faller R, Lee BW et al. Under the Influence of Alcohol: The Effect of Ethanol and Methanol on Lipid Bilayers. *Biophys J*. 2006;90:1121–1135. <http://doi.org/10.1529/biophysj.105.062364>.
 46. Lee SY, Park HJ, Best-Popescu C, Jang S, Park YK. The Effects of Ethanol on the Morphological and Biochemical Properties of Individual Human Red Blood Cells. *PLoS ONE*. 2015;10:e0145327. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0145327>.
 47. Welbourn EM, Wilson MT, Yusof A, Metodieva MV, Cooper CE. The mechanism of formation, structure and physiological relevance of covalent hemoglobin attachment to the erythrocyte membrane. *Free Radic Biol Med*. 2017;103:95–106. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.024>.
 48. Ebrahimi S, Bagchi P. A computational study of red blood cell deformability effect on hemodynamic alteration in capillary vessel networks. *Sci Rep*. 2022;12(1):4304. <http://doi.org/10.1038/s41598-022-08357-z>.
 49. Rabai M, Detterich JA, Wenby RB, Toth K, Meiselman HJ. Effects of ethanol on red blood cell rheological behavior. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2014;56(2):87–99. <http://doi.org/10.3233/CH-2012-1632>.
 50. Palmieri VO, Cicco G, Minerva F, Portincasa P, Grattagliano I, Memeo V, Palasciano G. Red blood cells (RBC) deformability and aggregability: alterations in alcoholism. *Adv Exp Med Biol*. 2006;578:125–131. https://doi.org/10.1007/0-387-29540-2_20.
 51. Liu L, Huang S, Xu X, Han J. Study of individual erythrocyte deformability susceptibility to INFeD and ethanol using a microfluidic chip. *Sci Rep*. 2016;6:22929. <http://doi.org/10.1038/srep22929>.
 52. Brun JF, Varlet-Marie E, Myzia J, Raynaud de Mauverger E, Pretorius E. Metabolic Influences Modulating Erythrocyte Deformability and Eryptosis. *Metabolites*. 2021;12(1):4. <http://doi.org/10.3390/metabo12010004>.
 53. Arendt BM, Ma DW, Simons B, Noureldin SA, Therapondos G, Guindi M et al. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with lower hepatic and erythrocyte ratios of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2013;38(3):334–340. <http://doi.org/10.1139/apnm-2012-0261>.
 54. Li Z, Agellon LB, Allen TM, Umeda M, Jewell L, Mason A et al. The ratio of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine influences membrane integrity and steatohepatitis. *Cell Metab*. 2006;3(5):321–331. <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.03.007>.
 55. Dinkla S, van Eijk LT, Fuchs B, Schiller J, Joosten I, Brock R et al. Inflammation-associated changes in lipid composition and the organization of the erythrocyte membrane. *BBA Clin*. 2016;5:186–192. <http://doi.org/10.1016/j.bbaci.2016.03.007>.
 56. Straface E, Gambardella L, Mattatelli A, Canali E, Boccalini F, Agati L et al. The red blood cell as a gender-associated biomarker in metabolic syndrome: a pilot study. *Int J Cell Biol*. 2011;2011:204157. <http://doi.org/10.1155/2011/204157>.
 57. Otogawa K, Kinoshita K, Fujii H, Sakabe M, Shiga R, Nakatani K et al. Erythrophagocytosis by liver macrophages (Kupffer cells) promotes oxidative stress, inflammation, and fibrosis in a rabbit model of steatohepatitis: implications for the pathogenesis of human nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Pathol*. 2007;170(3):967–980. <http://doi.org/10.2353/ajpath.2007.060441>.
 58. Elizondo A, Araya J, Rodrigo R, Poniachik J, Csendes A, Maluenda F et al. Polyunsaturated fatty acid pattern in liver and erythrocyte phospholipids from obese patients. *Obesity (Silver Spring)*. 2007;15(1):24–31. <http://doi.org/10.1038/oby.2007.518>.
 59. Notarnicola M, Caruso MG, Tutino V, Bonfiglio C, Cozzolongo R, Giannuzzi V et al. Significant decrease of saturation index in erythrocytes membrane from subjects with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Lipids Health Dis*. 2017;16(1):160. <http://doi.org/10.1186/s12944-017-0552-0>.
 60. Rose M, Veysey M, Lucock M, Niblett S, King K, Baines S et al. Association between erythrocyte omega-3 polyunsaturated fatty acid levels and fatty liver index in older people is sex dependent. *J Nutr Intermed Metab*. 2016;5:78–85. <http://doi.org/10.1016/j.jnim.2016.04.007>.
 61. Amirkalali B, Sohrabi MR, Esrafil A, Jalali M, Gholami A, Hosseinzadeh P et al. Erythrocyte membrane fatty acid profile & serum cytokine levels in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Indian J Med Res*. 2018;147(4):352–360. http://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_1065_16.
 62. Jacobs S, Jäger S, Jansen E, Peter A, Stefan N, Boeing H et al. Associations of Erythrocyte Fatty Acids in the De Novo Lipogenesis Pathway with Proxies of Liver Fat Accumulation in the EPIC-Potsdam Study. *PLoS ONE*. 2015;10(5):e0127368. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0127368>.
 63. Yoo JH, Kang YM, Cho YK, Lee J, Jung CH, Park JY et al. The haemoglobin glycation index is associated with nonalcoholic fatty liver disease in healthy subjects. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2019;91(2):271–277. <http://doi.org/10.1111/cen.14001>.
 64. Yu C, Wang L, Xue H, Lin H, Li Y, Chan SO. Association of glycated hemoglobin with the risk of advanced fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease patients without diabetes. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2019;43(1):58–66. <http://doi.org/10.1016/j.clinre.2018.08.007>.
 65. Chen C, Zhu Z, Mao Y, Xu Y, Du J, Tang X et al. HbA1c may contribute to the development of non-alcoholic fatty liver disease even at normal-range levels. *Biosci Rep*. 2020;40(1):BSR20193996. <http://doi.org/10.1042/BSR20193996>.
 66. Srivastava MR, Mahdi F, Mahdi AA, Ahmad S, Chandra A. Biological effects of C-peptide and proinsulin: we jibe together. *Era's J Med Res*. 2019;6(1):103–109. <http://doi.org/10.24041/ejmr.2019.115>.

Вклад авторов:

Концепция и дизайн исследования – М.В. Кручинина, М.Ф. Осипенко, А.В. Белковец, М.В. Паруликова

Написание текста – М.В. Кручинина, М.В. Паруликова, А.В. Белковец, Э.В. Кручинина

Сбор и обработка материала – М.В. Кручинина, М.В. Паруликова, А.В. Белковец, Э.В. Кручинина

Статистический анализ данных – М.В. Кручинина, Э.В. Кручинина

Редактирование – М.В. Кручинина, М.Ф. Осипенко

Contribution of authors:

Concept and design of the study – Margarita V. Kruchinina, Marina F. Osipenko, Marina V. Parulikova, Anna V. Belkovets

Text writing – Margarita V. Kruchinina, Marina V. Parulikova, Anna V. Belkovets, Elina V. Kruchinina

Collection and processing of material – Margarita V. Kruchinina, Marina V. Parulikova, Anna V. Belkovets, Elina V. Kruchinina

Statistical data analysis – Margarita V. Kruchinina, Elina V. Kruchinina

Editing – Margarita V. Kruchinina, Marina F. Osipenko

Информация об авторах:

Кручинина Маргарита Витальевна, д.м.н., доцент, заведующая лабораторией гастроэнтерологии, ведущий научный сотрудник лаборатории гастроэнтерологии, Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины Федерального исследовательского центра Института 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

Осипенко Марина Федоровна, д.м.н., профессор, заведующая кафедрой пропедевтики внутренних болезней, Новосибирский государственный медицинский университет; 630091, Россия, Новосибирск, Красный проспект, д. 52; ngma@bk.ru

Паруликова Марина Владимировна, преподаватель отдела образования, врач-гастроэнтеролог, Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины Федерального исследовательского центра Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук; 630089, Россия, Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, д. 175/1; врач-гастроэнтеролог, Новосибирский государственный медицинский университет; 630091, Россия, Новосибирск, Красный проспект, д. 52; m_parulikova@mail.ru

Белковец Анна Владимировна, д.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории гастроэнтерологии, заведующая клиникой, Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины Федерального исследовательского центра Института 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

Кручинина Элина Владимировна, клинический ординатор, Новосибирский государственный медицинский университет; 630091, Россия, Новосибирск, Красный проспект, д. 52; elinakruch@yandex.ru

Information about the authors:

Margarita V. Kruchinina, Dr. Sci. (Med.), Associate Professor, Leading Researcher, Head of the Laboratory of Gastroenterology, Research Institute of Internal and Preventive Medicine – Branch of the 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 of the Novosibirsk State Medical University; 52, Krasny Ave., Novosibirsk, 630091, Russia; kruchmargo@yandex.ru

Marina F. Osipenko, Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of Propaedeutics of Internal Diseases of the Novosibirsk State Medical University; 52, Krasny Ave., Novosibirsk, 630091, Russia; ngma@bk.ru

Marina V. Parulikova, Lecturer of the Department of Education, Gastroenterologist, Research Institute of Internal and Preventive Medicine – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; 175/1, Boris Bogatkov St., Novosibirsk, 630089, Russia; Gastroenterologist, Novosibirsk State Medical University; 52, Krasny Ave., Novosibirsk, 630091, Russia; m_parulikova@mail.ru

Anna V. Belkovets, Dr. Sci. (Med.), Associate Professor, Leading Researcher at the Laboratory of Gastroenterology, Head of the Clinic of the Research Institute of Internal and Preventive Medicine – Branch of the 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 of the Novosibirsk State Medical University; 52, Krasny Ave., Novosibirsk, 630091, Russia; a_belkovets@bk.ru

Elina V. Kruchinina, Clinical Resident, Novosibirsk State Medical University; 52, Krasny Ave., Novosibirsk, 630091, Russia; elinakruch@yandex.ru