

**ОСОБЕННОСТИ ЛИПИДОМИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ
МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ И СЫВОРОТКИ КРОВИ
У ПАЦИЕНТОВ С ЖИРОВОЙ БОЛЕЗНЬЮ ПЕЧЕНИ**

**М.В. Кручинина¹, М.В. Паруликова¹, С.А. Курилович¹, А.А. Громов¹, М.В. Шашков²,
А.С. Соколова³, В.Н. Кручинин⁴**

¹*НИИ терапии и профилактической медицины –
филиал ФГБНУ ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН
630089, г. Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, 175/1*

²*ФГБУН Институт катализа им. Г.К. Борескова СО РАН
630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 5*

³*ФГБУН Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН
630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 9*

⁴*ФГБУН Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова СО РАН
630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 13*

Цель работы — исследовать особенности состава жирных кислот мембран эритроцитов и сыворотки крови у пациентов с жировой болезнью печени алкогольного (АЖБП) и неалкогольного (НАЖБП) генеза для возможного использования в целях дифференциальной диагностики. Обследовано 80 мужчин ($51,8 \pm 3,9$ года) с АЖБП ($n = 28$) и НАЖБП ($n = 52$), а также 20 условно здоровых лиц. Исследование состава жирных кислот (ЖК) эритроцитов и сыворотки крови проведено с помощью хромато-масс-спектрометрической системы на основе трех квадруполов Agilent 7000B (США). Выявлены различия в уровнях и соотношении ЖК в сыворотке крови и мембранах эритроцитов у пациентов с АЖБП и НАЖБП. Повышенная этерификация жирных кислот, увеличение синтеза полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), усиливающих вызванные этанолом повреждения печени, значимая роль олеиновой и линолевой кислот ассоциированы с АЖБП. У пациентов с НАЖБП обнаружено повышение содержания потенциально липотоксичных насыщенных ЖК (маргариновой, стеариновой, арахидиновой, пентадекановой) при снижении концентрации мононенасыщенных (пальмитолеиновой, элаидиновой, олеиновой). Уменьшение содержания докозагексаеновой $n-3$ ПНЖК на фоне компенсаторного увеличения уровня докозапентаеновой ЖК $n-6$ при дефиците $n-3$, повышенный расход $n-6$ ПНЖК предполагают дефектную десатурацию ненасыщенных ЖК и возрастание интенсивности процессов перекисного окисления длинноцепочечных ПНЖК, ассоциированное с окислительным стрессом, особенности, связанные с резистентностью к инсулину. Синтез триглицеридов обеспечивает защитный механизм от токсической аккумуляции свобод-

Кручинина Маргарита Витальевна — д-р мед. наук, в.н.с., лаборатория гастроэнтерологии, e-mail: kruchmargo@yandex.ru

Паруликова Марина Владимировна — врач-гастроэнтеролог, зав. гастроэнтерологическим центром ЧУЗ «Клиническая больница «РЖД-Медицина» г. Новосибирск», старший преподаватель отдела образования, НИИТПМ — филиал ФИЦ ИЦиГ СО РАН, e-mail: m_parulikova@mail.ru

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

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

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

Соколова Анастасия Сергеевна — канд. хим. наук, н.с., лаборатория физиологически активных веществ, e-mail: asokolova@nioch.nsc.ru

Кручинин Владимир Николаевич — канд. хим. наук, н.с., лаборатория эллипсометрии, e-mail: vladd.kruch@yandex.ru

© Кручинина М.В., Паруликова М.В., Курилович С.А., Громов А.А., Шашков М.В., Соколова А.С., Кручинин В.Н., 2020

ных ЖК в печени. Установлены корреляции между уровнем ЖК фосфолипидов эритроцитов и компонентами метаболического синдрома, маркерами потребления алкоголя. Получены пилотные диагностические модели, позволяющие отличить пациентов с НАЖБП и АЖБП от здоровых лиц (AUC 0,892, чувствительность 0,82, специфичность 0,88 для НАЖБП; AUC 0,811, чувствительность 0,74, специфичность 0,80 для АЖБП), а также НАЖБП от АЖБП (AUC 0,790, чувствительность 0,73, специфичность 0,78). Жирно-кислотные профили мембран эритроцитов, сыворотки крови являются надежными биомаркерами нарушений в метаболизме липидов у пациентов с ЖБП различного генеза и перспективны с точки зрения дифференциальной диагностики.

Ключевые слова: жировая болезнь печени, алкогольный, неалкогольный генез, жирные кислоты, эритроциты, сыворотка крови, диагностика.

Жировая болезнь печени (ЖБП) относится к числу весьма распространенных заболеваний с тенденцией к росту как в России (~37,3 %, данные DIREG 2, 2015), так и в странах Европы, США (20–33 %). Исследования, проведенные разными авторами, убедительно доказывают ключевую роль патологии печени в развитии и прогрессировании метаболического синдрома, атеросклероза [1]. Среди различных этиологических факторов, приводящих к развитию ЖБП, наиболее частыми следует считать алкоголь (алкогольная жировая болезнь печени – АЖБП) и метаболические (неалкогольная жировая болезнь печени – НАЖБП) [2, 3]. Эпидемиологическое соотношение АЖБП/НАЖБП составляет (10–15):1. При пункционной биопсии по поводу диффузной патологии печени неалкогольный стеатогепатит обнаружен в 7–9 % [4].

При детальном анализе данных патологий прослеживается общность звеньев патогенеза АЖБП и НАЖБП, это, прежде всего, активация перекисного окисления липидов, окислительный стресс, поражение фосфолипидов мембран митохондрий, нарушение системного и клеточного звеньев липидного обмена. Также можно предположить «перекрест» предрасполагающих факторов: ожирения, инсулинрезистентности, гиперлипидемии, нарушения кишечного пищеварения. Течение и прогноз НАЖБП и АЖБП во многом определяют наличие общих факторов прогрессирования, но вместе с тем актуально выявление наиболее значимого пускового фактора, поскольку это определяет тактику ведения пациентов, акценты в терапии. Исследования Y. Jia et al. продемонстрировали более высокий потенциал прогрессирования в аденокарциному алкогольной жировой болезни печени по сравнению с неалкогольной [5]. Имеющиеся методы и подходы разграничения АЖБП и НАЖБП не позволяют в полной мере решить данную сложную проблему [2, 6]. Вместе с тем в связи с отличием этиологического фактора вероятно существование значимых различий в уровнях и соотношении метаболитов, в том числе липидных. Это определяет возможности разработки новых

способов дифференциальной диагностики АЖБП и НАЖБП с использованием липидома.

Цель работы – исследовать особенности состава ЖК мембран эритроцитов и сыворотки крови у пациентов с жировой болезнью печени АЖБП и НАЖБП для возможного использования в целях дифференциальной диагностики.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Обследовано 80 мужчин ($51,8 \pm 3,9$ года) с АЖБП ($n = 28$) и НАЖБП ($n = 52$), а также 20 условно здоровых лиц. У всех пациентов по данным УЗИ брюшной полости выявлены признаки ЖБП, наличие которой подтверждено индексом NLFS (NAFLD liver fat score), превышавшим $-0,64$. Степень выраженности фиброза печени установлена методом непрямой эластометрии на аппарате FibroScan® 502 Echosens (Франция) с разграничением стадии фиброза по шкале METAVIR от F0 до F4. Исследование состава ЖК эритроцитов и сыворотки крови проведено с помощью хромато-масс-спектрометрической системы на основе трех квадрупольных Agilent 7000B (США). Концентрацию ЖК выражали в относительных процентах. Предел обнаружения ЖК ~ 1 мкг на образец. Пробоподготовка, процесс определения, особенности методики исследования ЖК подробно представлены в работе [7].

Для сравнения между двумя независимыми группами применяли t-тест Стьюдента, t-тест Уэлча, тест Манна – Уитни и/или тест χ . Ранговые коэффициенты корреляции Спирмена использовали для оценки корреляций между дискретными переменными. Оценка диагностической точности панелей показателей произведена с помощью ROC-анализа. Во всех процедурах статистического анализа критический уровень значимости нулевой гипотезы (p) принимали равным 0,05.

Исследование одобрено Этическим комитетом ФГБНУ НИИ терапии и профилактической медицины (протокол заседания № 122 от

29.11.2016). Все обследуемые 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

Особенности проявлений ЖБП

Минимальная биохимическая активность процесса отмечена у 38 человек, умеренная — у 42. Лабораторные признаки цитолиза обнаружены у 43 % больных ЖБП, уровень сыровоточных трансаминаз не превышал трех норм, при этом активность АлАТ была больше, чем активность АсАТ. У 38 % больных выявлено повышение активности щелочной фосфатазы (не более чем двукратное) и гамма-глутамилтранспептидазы. Гипербилирубинемия (преимущественно смешанная) в пределах 1,5 нормы имела место в 32 % случаев. Диспротеинемия различной степени выраженности наблюдалась у 18 % пациентов. Стадия болезни определялась на основании клинических, биохимических и инструментальных исследований. Ультразвуковое исследование и компьютерная томография позволили верифицировать наличие гепатомегалии у всех пациентов, косвенно оценить степень фиброза печени у большинства обследуемых как умеренную (F2) (что впоследствии было подтверждено методом непрямого эластометрии); признаки формирования портальной гипертензии отсутствовали. Вирусная этиология заболевания исключена на основании отсутствия серологических маркеров методом иммуноферментного анализа и/или ДНК и РНК вирусов методом полимеразной цепной реакции. Алкогольный генез стеатоза устанавливался по данным достоверно подтвержденного отсутствия или наличия систематического потребления алкоголя в настоящее время и в анамнезе (по данным стандартного опроса, в том числе с помощью CAGE-опросника, AUDIT).

У 59 (73,8 %) пациентов общей группы ЖБП представляла собой проявление метаболического синдрома. У 67,5 % больных выявлено абдоминально-висцеральное ожирение с индексом массы тела более 30 кг/м². Артериальная гипертензия II степени обнаружена у всех обследованных. Сахарный диабет 2 типа выявлен у 52,5 %, у 18,8 % отмечено нарушение толерантности к глюкозе. У 92,5 % больных было опре-

делено наличие инсулинрезистентности. Атерогенная дислипидемия наблюдалась у всех обследованных: в 15 % случаев — гиперлипидемия 2А, в 85 % — гиперлипидемия 2Б. У 83,8 % пациентов выявлена гиперурикемия.

Клинико-инструментальная характеристика групп представлена в таблице, из ее данных следует, что группы обследованных достоверно не различались по возрасту.

Таким образом, в группе пациентов с АЖБП поражение печени развилось на фоне многолетнего употребления алкоголя в неблагоприятном, в отношении соматических осложнений, стиле, отмечена большая биохимическая активность процесса, выраженность нестабильности мембран клеток. У больных с НАЖБП патология печени являлась проявлением метаболического синдрома, биохимическая активность диффузной патологии печени была минимальной, тем не менее в данной группе выявлен умеренный и выраженный фиброз (у большинства пациентов он находился на уровне F2-3).

Содержание ЖК в сыроворотке крови

В сыроворотке крови больных с НАЖБП процентное содержание миристиновой (C14:0), олеиновой (C18:1;c9), элаидиновой (C18:1;t9), C22:6/C22:5 *n*-6 ЖК, а также сумма мононенасыщенных ЖК, отношение *n*-6/*n*-3 были ниже, а процентное содержание стеариновой (C18:0), арахидиновой (C20:0), докодиеновой (C20:2 *n*-6), дигомо-γ-линоленовой (C20:3 *n*-6), арахидиновой (C20:4 *n*-6), эйкозапентаеновой (C20:5 *n*-3), докозапентаеновой (C22:5 *n*-3), докозагексаеновой (C22:6 *n*-3) ЖК, а также сумма *n*-3, C20:5 *n*-3 + C22:6 *n*-3 — выше, чем у здоровых ($p < 0,001-0,05$) (рис. 1, 2). У пациентов с АЖБП уровни сыровоточных лауриновой (C12:0), пентадекановой (C15:0), линолевой (C18:2 *n*-6), сумма ненасыщенных ЖК (ННЖК), сумма *n*-6 полиненасыщенных ЖК (ПНЖК), отношение *n*-6/*n*-3 оказались достоверно ниже, а докодиеновой (C20:2 *n*-6), эйкозапентаеновой (C20:5 *n*-3), докозапентаеновой (C22:5 *n*-3), докозагексаеновой (C22:6 *n*-3), сумма насыщенных ЖК (НЖК), сумма *n*-3 ПНЖК, C20:5 *n*-3 + C22:6 *n*-3 (ЕРА+DHA), отношение НЖК/ННЖК — выше, чем в группе сравнения (см. рис. 1, 2). При сравнении профиля сыровоточных ЖК пациентов с ЖБП разного генеза установлено, что у больных с НАЖБП содержание миристиновой (C14:0), олеиновой (C18:1;c9), элаидиновой (C18:1;t9), эйкозапентаеновой (C20:5 *n*-3), суммы всех мононенасыщенных ЖК, суммы ПНЖК, отношения НЖК/ПНЖК достоверно меньше, чем у лиц с АЖБП,

Клинико-инструментальная характеристика групп обследуемых

Показатель	Группа сравнения, <i>n</i> = 20	1-я группа (АЖБП), <i>n</i> = 28	2-я группа (НАЖБП), <i>n</i> = 52
1	2	3	4
Возраст, лет	54,7 ± 1,3	55,8 ± 2,1	57,9 ± 1,3
Проявления метаболического синдрома, <i>n</i> (%)	—	7 (25)	52 ^{^^} (100)
Нарушения углеводного обмена, <i>n</i> (%)	—	6 ^{^^} (21,4)	52 (100)
ИМТ, кг/м ²	24,2 ± 1,3	25,8 ± 1,0 ^{^^^}	34,2 ± 0,86 **
Окружность талии, см	91,0 ± 7,0	90,0 ± 10,0 ^{^^}	120,0 ± 10,0*
Избыточная масса тела, <i>n</i> (%)	—	7 ^{^^} (25)	52 (100)
Дислипидемии, <i>n</i> (%)			
ГЛП 2А	—	8 ^{^^} (28,6)	4 (7,7)
ГЛП 2Б	—	20 (71,4)	48 (92,3)
Курильщики, <i>n</i> (%)	1 (5)	19 (67,9) ^{****,^^^}	4 (7,7)*
Употребление алкоголя, <i>n</i> (%)	2 (10)	28 ^{****,^^^} (100)	5 (9,6)
Стаж употребления, лет	—	23,1 ± 1,7 ^{^^^}	3,62 ± 1,1
Недельная доза (в пересчете на чистый этанол), мл	13,4 ± 3,9	284,0 ± 20,0 ^{****,^^^}	16,3 ± 2,5
Степень фиброза печени (НЭМ), <i>n</i> (%)			
F2	—	21 (75)	37 (71)
F3	—	7 (25)	15 (29)
Нарушения ритма и проводимости сердца, <i>n</i> (%)	—	22 ^{^^^} (78,6)	15 (28,8)
Хроническая обструктивная болезнь легких, <i>n</i> (%)	—	10 [^] (35,7)	8 (15,3)
Инфекции мочевых путей, <i>n</i> (%)	—	11 (39,3)	16 (30,8)
Нарушения функции щитовидной железы, <i>n</i> (%)	—	5 ^{^^} (17,9)	21 (40,4)
Наличие артериальной гипертензии, <i>n</i> (%)	—	26 (92,9)	52 (100)
Признаки гипертрофии левого желудочка (индекс Соколова–Лайона > 38 мм и/или ИММЛЖ ≥125 г/м ²), <i>n</i> (%)	—	26 (92,9)	52 (100)
Продолжительность артериальной гипертензии, лет	—	8,3 ± 2,7	12,2 ± 3,5
Содержание общего холестерина, мг/дл	165,7 ± 6,3	215,1 ± 6,9 ^{**,^}	233,0 ± 9,3 ^{***}
Содержание холестерина ЛПВП, мг/дл	53,2 ± 1,4	49,6 ± 1,5 ^{**,^}	41,4 ± 1,7 ^{****}
Содержание холестерина ЛПНП, мг/дл	112,6 ± 2,0	147,5 ± 3,9 ^{**,^^}	169,3 ± 2,5 ^{***}
Содержание триглицеридов, мг/дл	145,5 ± 11,6	209,6 ± 21,5 ^{**,^^}	232,4 ± 12,2 ^{***}
Содержание глюкозы в крови натощак, ммоль/л	4,5 ± 1,1	6,62 ± 0,26 ^{**,^^}	7,10 ± 0,28 ^{***}
Индекс НОМА	2,1 ± 0,6	3,2 ± 0,8 ^{^^}	9,5 ± 1,0 ^{**}
Содержание общего белка, г/л	74,5 ± 0,9	73,1 ± 0,8	72,8 ± 0,7
Содержание альбумина, г/л	44,6 ± 0,8	42,5 ± 0,8	43,4 ± 0,6
Активность АлАТ, ЕД/л	14,2 ± 1,4	50,57 ± 5,6 ^{****,^^}	27,9 ± 2,6 ^{****}
Активность АсАТ, ЕД/л	12,7 ± 2,2	55,75 ± 7,7 ^{****,^^}	23,9 ± 1,5 ^{****}
Активность ГГТП, ЕД/л	15,3 ± 1,8	77,2 ± 11,1 ^{****,^^^}	40,8 ± 6,6 ^{***}
Активность щелочной фосфатазы, ЕД/л	124,2 ± 5,3	233,0 ± 16,3 ^{****,^^}	179,7 ± 6,6 ^{**}
Активность амилазы, ЕД/л	47,2 ± 5,1	64,8 ± 4,8	56,1 ± 7,6
Содержание общего билирубина, мкмоль/л	11,9 ± 0,9	18,6 ± 2,3 [^]	12,3 ± 0,8*
Содержание прямого билирубина, мкмоль/л	3,6 ± 0,5	9,1 ± 1,9 ^{****,^^}	5,5 ± 0,3*
Тимолова проба, ед.	1,1 ± 0,9	4,7 ± 1,5 ^{**,^^}	3,5 ± 1,6
Содержание мочевой кислоты, мг/дл	167,7 ± 11,5	377,8 ± 18,8 ^{****,^^^}	331,7 ± 16,1 ^{*,^^^}
Содержание креатинина, мкмоль/л	57,7 ± 1,8	85,0 ± 2,4 ^{**}	76,8 ± 1,2*

Окончание таблицы

1	2	3	4
Содержание мочевины, ммоль/л	5,3 ± 1,8	6,2 ± 1,9*,^	7,3 ± 2,1
Содержание железа в сыворотке, мкмоль/л	10,3 ± 1,4	16,7 ± 1,9**,^^	16,9 ± 1,2
ОЖСС, мг/дл	59,7 ± 3,8	53,0 ± 3,0	66,9 ± 10,7
Количество эритроцитов, × 10 ¹² /л	4,59 ± 0,10	4,56 ± 0,10	4,54 ± 0,05
Уровень гемоглобина, г/л	145,6 ± 2,7	137,7 ± 2,0	140,9 ± 3,6
Цветовой показатель	0,94 ± 0,01	0,93 ± 0,02	0,89 ± 0,01
Количество ретикулоцитов, %	0,6 ± 0,05	1,7 ± 0,2***,^^	1,0 ± 0,04**
СОЭ, мм/ч	9,2 ± 1,6	16,4 ± 2,1***,^^	20,0 ± 1,4*
Количество тромбоцитов, × 10 ⁹ /л	246,6 ± 9,5	221,8 ± 10,8	212,6 ± 8,3
Количество лейкоцитов, × 10 ⁹ /л	5,2 ± 0,29	6,80 ± 0,45	6,57 ± 0,30

Примечание. Непрерывные переменные представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее арифметическое значение, m – ошибка среднего; ИММЛЖ – индекс массы миокарда левого желудочка; ЛПВП – липопротеины высокой плотности; ЛПНП – липопротеины низкой плотности; ГГТП – гамма-глутамилтранспептидаза; ОЖСС – общая железосвязывающая способность сыворотки; обозначены статистически значимые отличия от величин соответствующих показателей группы сравнения (* – при $p < 0,05$, ** – при $p < 0,01$, *** – при $p < 0,001$, **** – при $p < 0,0001$) и пациентов с НАЖБП (^ – при $p < 0,05$, ^^ – при $p < 0,01$, ^^^ – при $p < 0,001$, ^^^^ – при $p < 0,0001$).

и, напротив, достоверно выше уровень пентадекановой (C15:0), арахидиновой (C20:0), арахидоновой (C20:4 $n-6$), суммы $n-6$ ПНЖК (см. рис. 1, 2).

Содержание ЖК в мембранах эритроцитов

В мембранах эритроцитов больных с НАЖБП относительное содержание лауриновой (C12:0), пентадекановой (C15:0), пальмитолеиновой (C16:1;9), олеиновой (C18:1;9), элаидиновой (C18:1;9), линолевой (C18:2 $n-6$), арахидоновой (C20:4 $n-3$), эйкозапентаеновой (C20:5 $n-3$), докозагексаеновой (C22:6 $n-3$), C22:6 $n-3$ /C22:5 $n-6$ (DNA/DPA $n-6$) ЖК, сумма ненасыщенных, моно-, полиненасыщенных, сумма $n-6$ ПНЖК, сумма $n-6$ /сумма $n-3$ были достоверно ниже, а маргарининовой (C17:0), стеариновой (C18:0), арахидиновой (C20:0), сумма насыщенных ЖК, НЖК/ННЖК, НЖК/ПНЖК – достоверно выше, чем у здоровых людей (рис. 3, 4). У пациентов с АЖБП уровень эритроцитарных маргарининовой (C17:0), олеиновой (C18:1;9), линолевой (C18:2 $n-6$), арахидоновой (C20:4 $n-6$), эйкозапентаеновой (C20:5 $n-3$), докозатетраеновой (C22:4 $n-6$), докозагексаеновой (C22:6 $n-3$) ЖК, сумма ненасыщенных, полиненасыщенных, сумма $n-6$ ПНЖК, сумма $n-6$ /сумма $n-3$ оказались достоверно ниже, а содержание пальмитиновой (C16:0), сумма НЖК, отношения НЖК/ННЖК и НЖК/ПНЖК – выше, чем в группе сравнения (см. рис. 3, 4). При сравнении профиля эритроцитарных ЖК пациентов с НАЖБП и АЖБП выявлено, что при НАЖБП достоверно

меньше, чем при АЖБП, содержание лауриновой (C12:0), пальмитолеиновой (C16:1;9), элаидиновой (C18:1;9) ЖК, и, напротив, выше, чем при АЖБП, уровни маргарининовой (C17:0), стеариновой (C18:0), арахидиновой (C20:0), докозагексаеновой (C22:6 $n-3$), отношения НЖК/ННЖК, НЖК/ПНЖК (см. рис. 3, 4).

Содержание этиловых эфиров ЖК фосфолипидов мембран эритроцитов (пальмитиновой, олеиновой, линолевой) у больных с АЖБП оказалось достоверно выше таковых у больных с НАЖБП и здоровых лиц ($p = 0,001-0,002$). Отношение DNA /DPA $n-6$ при НАЖБП было достоверно ниже таковых в контроле как для мембран эритроцитов, так и для сыворотки крови ($p < 0,001$) (рис. 5).

При проведении корреляционного анализа обнаружены ассоциации уровней ЖК в мембранах эритроцитов и сыворотке крови с проявлениями метаболического синдрома у пациентов с НАЖБП (рис. 6), потребления алкоголя у больных с АЖБП (рис. 7). Так, суммарное содержание ПНЖК в мембранах эритроцитов отрицательно коррелировало с окружностью талии, а соотношение DNA/DPA $n-6$ – с величиной индекса НОМА в группе с НАЖБП. Частота потребления алкоголя у пациентов с АЖБП оказалась обратносвязанной с уровнем эйкозапентаеновой кислоты в мембранах эритроцитов, а активность ГГТП – с содержанием линолевой кислоты. Получены прямые ассоциации недельной дозы потребляемого этанола с уровнем этиловых эфиров ЖК в мембранах эритроцитов.

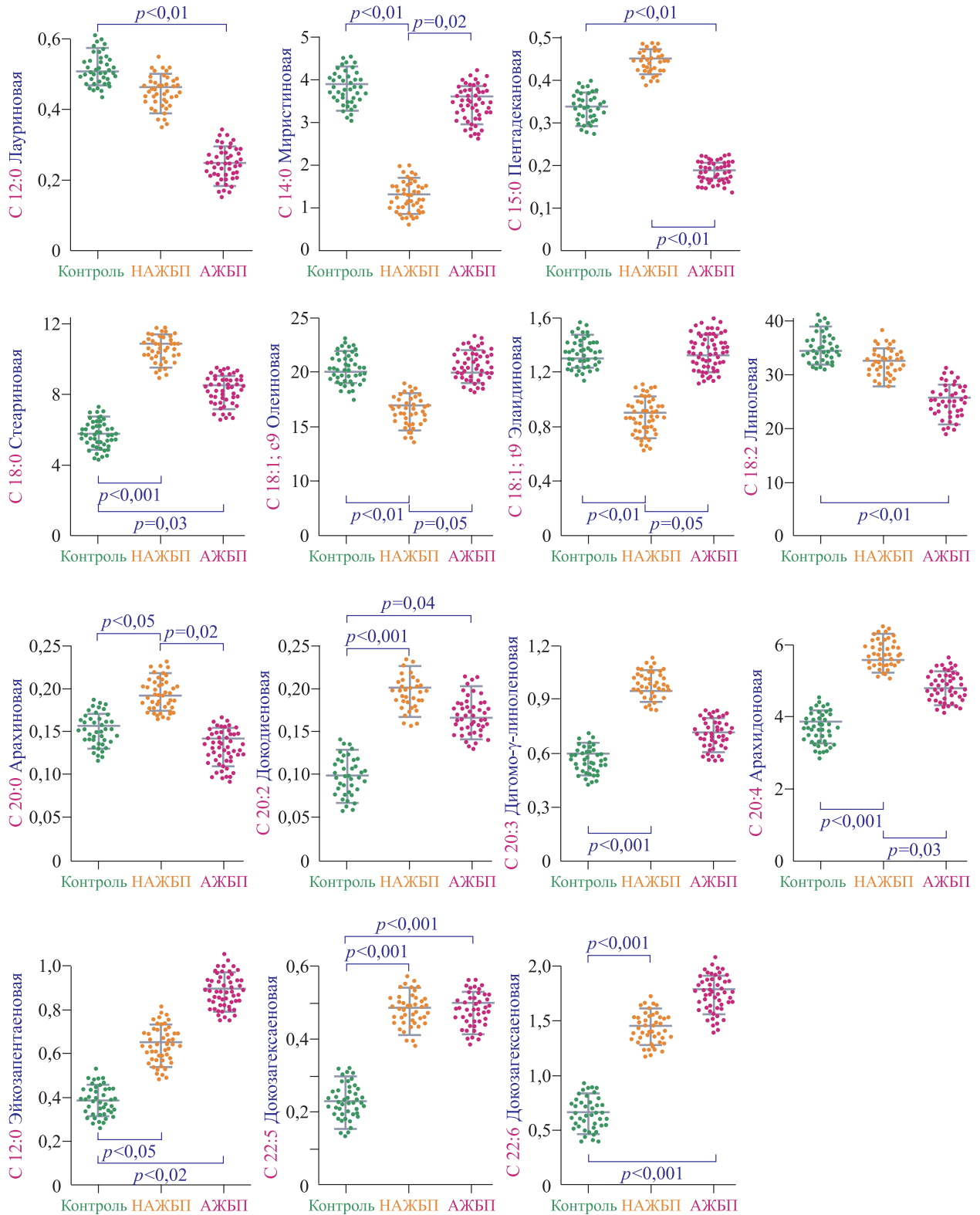


Рис. 1. Содержание отдельных ЖК в сыворотке крови пациентов с НАЖБП, АЖБП и в группе сравнения, %

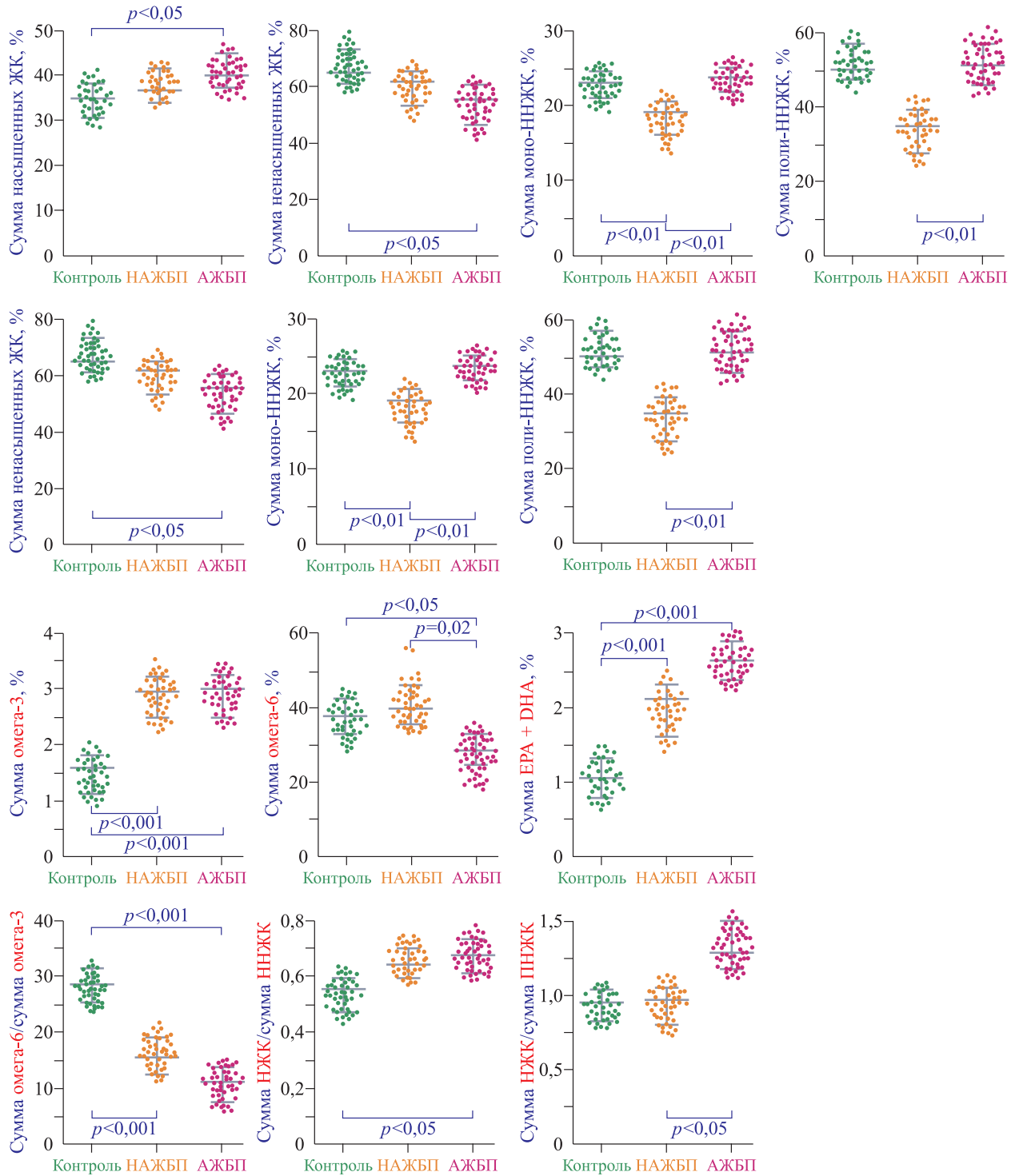


Рис. 2. Суммарные уровни ЖК в сыворотке крови пациентов с НАЖБП, АЖБП и в группе сравнения, %

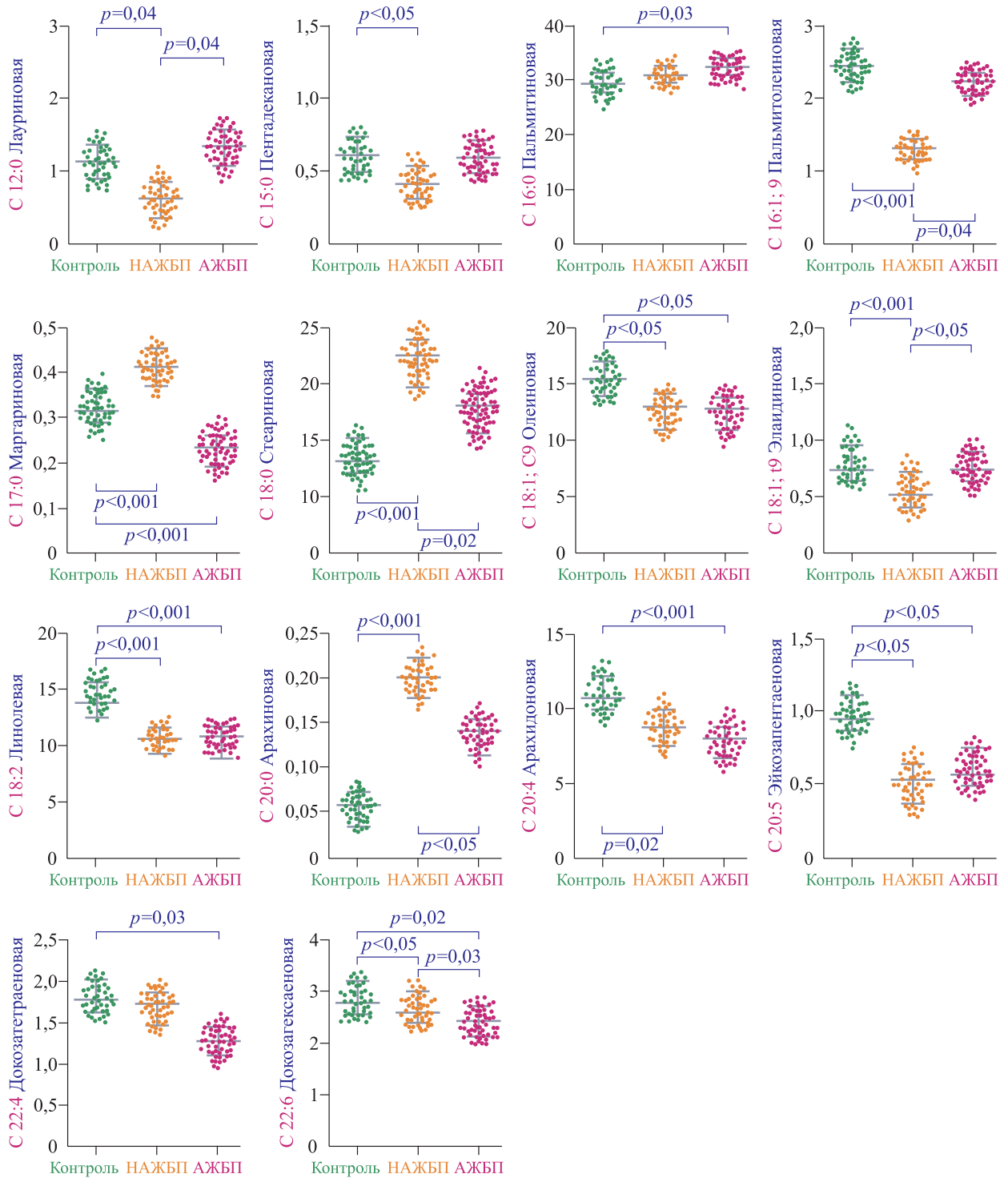


Рис. 3. Содержание отдельных ЖК в мембранах эритроцитов пациентов с НАЖБП, АЖБП и в группе сравнения, %

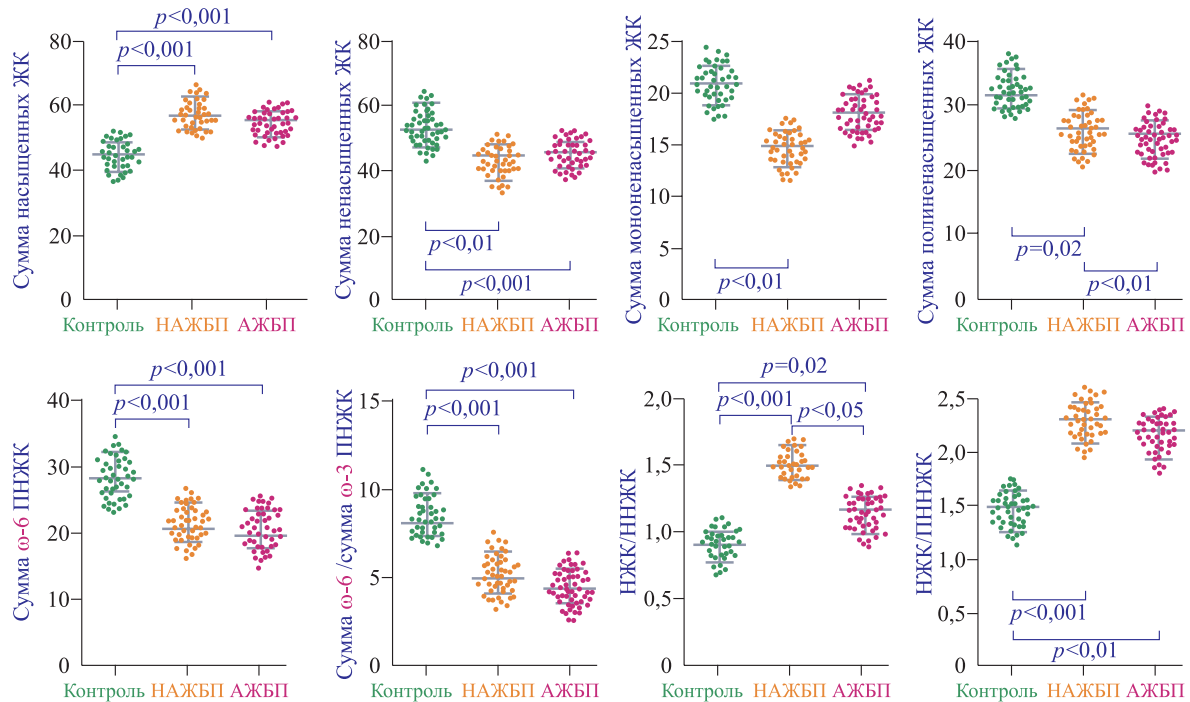


Рис. 4. Суммарные уровни ЖК в мембранах эритроцитов пациентов с НАЖБП, АЖБП и в группе сравнения, %

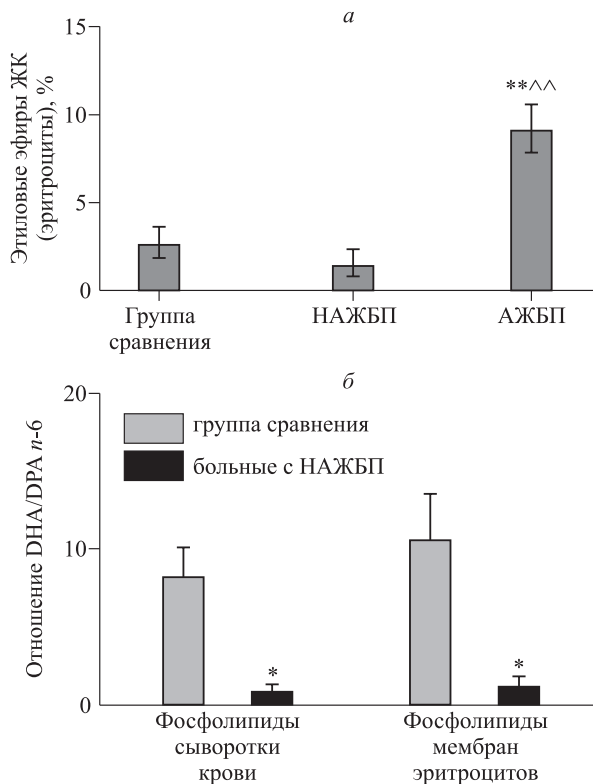


Рис. 5. Содержание этиловых эфиров ЖК мембран эритроцитов (а) и отношение DNA/DPA n-6 (б) у пациентов с НАЖБП, АЖБП и в группе сравнения

Выявленные дифференцирующие ЖК легли в основу создания пилотных «панелей», позволяющих отличить пациентов с АЖБП и НАЖБП от здоровых лиц, а также между собой. Проведенный ROC-анализ продемонстрировал их достаточную диагностическую точность: при различении больных НАЖБП и здоровых людей — AUC 0,892, чувствительность 0,82, специфичность 0,88; при дифференцировании пациентов с АЖБП и здоровых — AUC 0,811, чувствительность 0,74, специфичность 0,80; при различении НАЖБП и АЖБП — AUC 0,790, чувствительность 0,73, специфичность 0,78 (рис. 8). Панель 1, позволявшая различить пациентов с НАЖБП и здоровых людей, включала уровни ЖК сыворотки (C20:2 n-6, 20:3 n-6, 20:4 n-6, 22:5 n-3, 22:6 n-3, DNA/DPA n-6, сумма n-3, EPA+DNA, n-6/n-3) и ЖК мембран эритроцитов (C20:0, 18:1;t9, 16:1;9, DNA/DPA n-6, сумма n-6, n-6/n-3, НЖК/ННЖК, НЖК/ПНЖК). Панель 2, предполагавшая дифференцирование больных с АЖБП и здоровых лиц, состояла из ЖК сыворотки (C14:0, 22:5 n-3, 22:6 n-3, сумма n-3) и ЖК мембран эритроцитов (C14:0, 16:0, 18:0, 18:1;c9, C18:2 n-6, C20:4 n-6, сумма n-3, НЖК/ННЖК). Наконец, панель 3 для различения больных с НАЖБП и АЖБП включала сывороточные ЖК (C14:0, 15:0, 20:0, 20:4 n-6, сумма мононенасыщенных

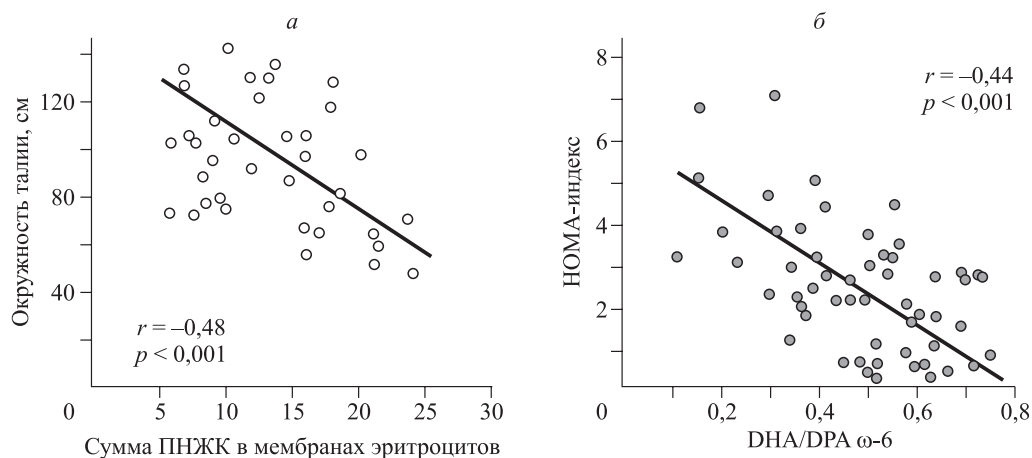


Рис. 6. Корреляция уровней ЖК с окружностью талии (а) и индексом НОМА (б) у пациентов с НАЖБП

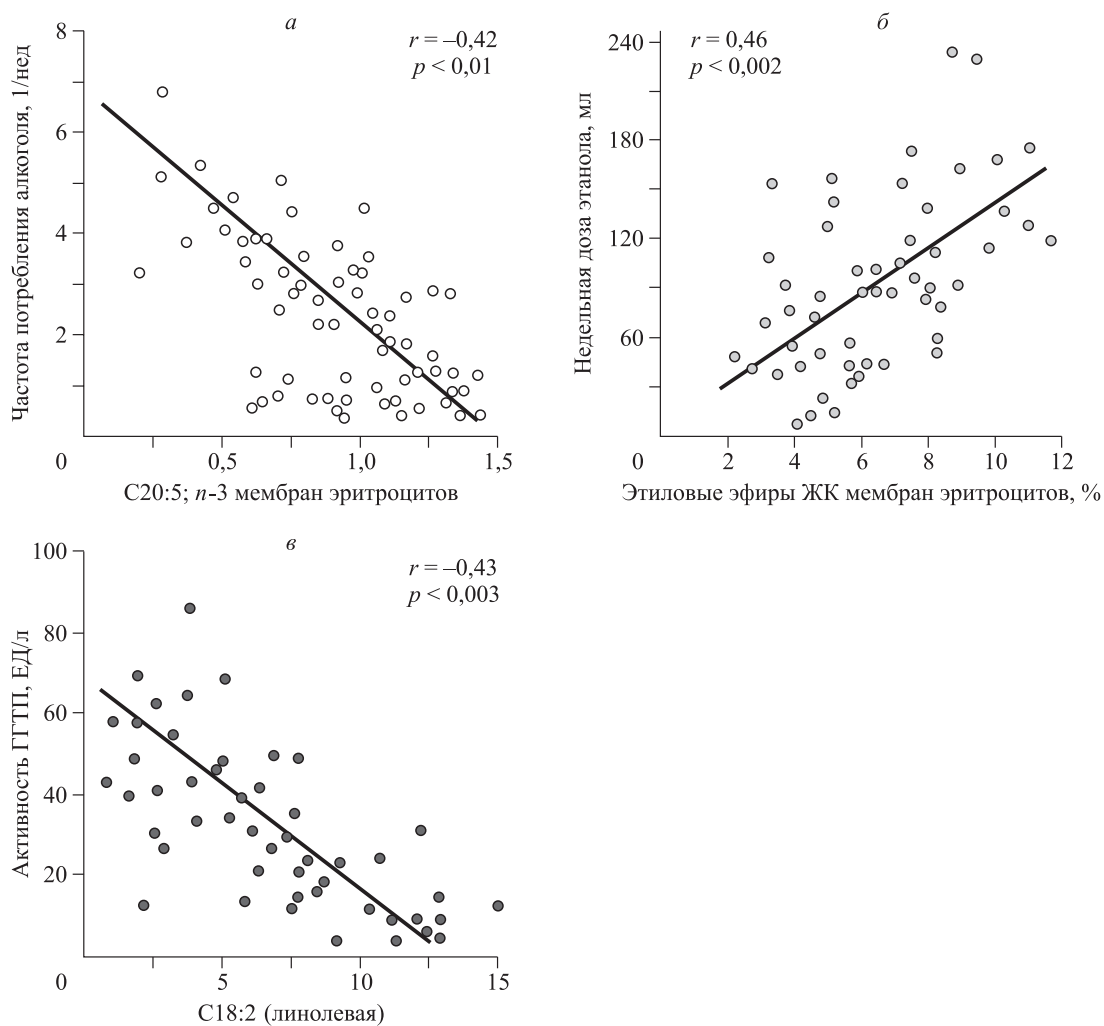


Рис. 7. Корреляция уровней ЖК с показателями потребления алкоголя: частотой (а), недельной дозой (б) и активностью ГГТП (в) у пациентов с АЖБП

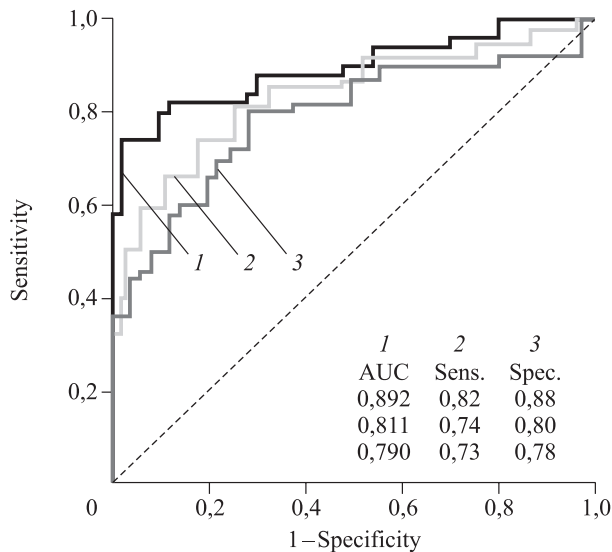


Рис. 8. Данные ROC-анализа для потенциальных биомаркеров по различению АЖБП, НАЖБП. Панель 1 – больные НАЖБП и здоровые лица, панель 2 – пациенты с АЖБП и здоровые люди, панель 3 – больные НАЖБП и АЖБП

ЖК, сумма ПНЖК, сумма $n-6$) и эритроцитарные ЖК (C18:0, 22:6 $n-3$, НЖК/ННЖК, НЖК/ПНЖК).

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе параллельно исследованы уровни ЖК сыворотки крови и эритроцитов. Данный аспект имеет смысл, поскольку известно о взаимодействии и взаимообмене компонентов сыворотки и мембран эритроцитов между собой [8]. Состав ЖК сывороточных липидов считается надежным показателем, отражающим потребление ЖК в течение нескольких недель или месяцев [9, 10]. Изменения состава ЖК в эритроцитах происходят в более отдаленные сроки, чем в сыворотке крови [11]. Вместе с тем жирно-кислотный состав мембран эритроцитов считается более стабильным, чем жирно-кислотный состав сыворотки крови, в связи с большей зависимостью последнего от диетических привычек [11].

Установлено, что для ряда ЖК тренды к снижению или повышению уровней в сыворотке крови и эритроцитах совпадали. Так, для пациентов с НАЖБП по сравнению со здоровыми людьми однонаправленно меньше и в сыворотке, и в мембранах эритроцитов была концентрация олеиновой, элаидиновой, соотношений C22:6/C22:5 $n-6$, $n-6/n-3$ и суммы мононенасыщенных ЖК и, напротив, больше содержание стеариновой ЖК. У больных с АЖБП в сыво-

ротке крови и мембранах эритроцитов оказались ниже по сравнению с контролем уровни линолевой, суммы ненасыщенных ЖК, суммы $n-6$, отношения $n-6/n-3$, при этом выше – сумма насыщенных ЖК, отношение НЖК/ННЖК. Сравнение пациентов с ЖБП разного генеза выявило низкое содержание элаидиновой ЖК в сыворотке крови и мембранах эритроцитов у пациентов с НАЖБП по сравнению с больными АЖБП и, напротив, – высокое содержание арахидиновой ЖК.

Вместе с тем ряд ЖК в обеих группах продемонстрировал противоположные тенденции для сыворотки крови и мембран эритроцитов. Так, у пациентов с НАЖБП уровень C20:4 $n-6$, C20:5 $n-3$, C22:6 $n-3$ в сыворотке крови оказался выше, а в мембранах эритроцитов – ниже, чем у здоровых лиц. У больных с АЖБП тот же тренд выявлен в отношении C20:5 $n-3$ и C22:6 $n-3$. Следует отметить, что перечень большей части ЖК, значимых для различения НАЖБП и АЖБП, для сыворотки крови и мембран эритроцитов отличался. Данное обстоятельство позволило создать пилотные диагностические модели, в которых одновременно использованы уровни ЖК сыворотки крови и мембран эритроцитов.

Различия в уровнях и соотношении ЖК у пациентов с АЖБП и НАЖБП, наблюдаемые в настоящем исследовании, могут быть обусловлены рядом обстоятельств. Прежде всего это связано с различными механизмами действия этиологических факторов, ведущих к развитию данных заболеваний. В процессе окисления алкоголя, при его хроническом потреблении (феномен «NAD-пары»), происходит повышенный синтез глицеро-3-фосфата, последствием чего является увеличение этерификации ЖК. В результате повышается синтез триглицеридов, нарушается окислительно-восстановительный потенциал гепатоцитов и возрастает накопление глицеро-3-фосфата в печени. В результате увеличения концентрации NADH в печени более интенсивно синтезируются ЖК и уменьшается их β -окисление митохондриями гепатоцитов. У пациентов с алкогольным поражением печени повышается содержание растворимой синтазы ЖК и ее лигандов, синтезируемых в гепатоцитах, клетках Купфера и полиморфно-ядерных клетках печени [3]. Под влиянием алкоголя приостанавливаются другие окислительные процессы, в том числе и расщепление ЖК. Скорость β -окисления ЖК снижается вследствие уменьшения активности карнитинпальмитилтрансферазы, локализованной на внутренней мембране митохондрий. Усиливается захват ЖК из плазмы за счет увеличения синтеза связывающего транспортного белка. Нарушается вклю-

чение триглицеридов в состав липопротеинов очень низкой плотности, что приводит к их накоплению в печени [2, 3].

Этанол при участии цитоплазматической эстеразы взаимодействует с длинноцепочечными ЖК, в основном пальмитиновой, олеиновой и линолевой, с образованием их эфиров, что подтверждается результатами настоящего исследования. Способность эфиров этих кислот удерживаться в связанном с белками состоянии значительно меньше, чем у неэтерифицированных ЖК. Последнее обеспечивает их массивное поступление в митохондрии с последующей деэтерификацией, где вновь образованные ЖК реализуют свой токсический эффект. Скорость синтеза этиловых эфиров ЖК весьма высока (около 40 нМ/г ткани в час), а их содержание в тканях сердца у лиц, погибших в состоянии острой алкогольной интоксикации, увеличено в 3–4 раза. Выявленная корреляция уровня этиловых эфиров с недельной дозой потребляемого этанола отражает их повышенный синтез в условиях алкоголизации высокими дозами этанола. Механизм токсического действия эфиров ЖК определяется их способностью ингибировать Na^+ , K^+ -АТФазу, угнетать дыхание митохондрий, активировать перекисное окисление липидов в мембранах митохондрий и разобщать окисление и фосфорилирование. Избыточное накопление ЖК в тканях при алкогольной интоксикации и нарушение их утилизации тканями из-за конкурентного влияния ацетата создают дополнительные благоприятные условия для их взаимодействия с этанолом [12].

Рядом исследователей показана роль отдельных ЖК в развитии АЖБП. Так, G. Chang et al. в модели на мышах продемонстрировали, что стеариновая кислота C18:0 в биосинтезе насыщенных ЖК является маркером алкогольного поражения печени [13]. Влияние этанола на печень может быть модулировано статусом питания. Так, если параллельно с этанолом мышам давали ПНЖК (кукурузное масло с линолевой ЖК), поражение печени у них было более выраженным, чем при добавлении в диету насыщенных ЖК [14]. Информация о том, что диетические НЖК оказывают защитное действие, тогда как пищевые ненасыщенные жиры усугубляют течение алкогольной болезни печени, подтверждена исследованиями [15–17]. Страны, где преобладают диеты с высоким содержанием насыщенных жиров, имеют более низкую частоту АЖБП в связи с меньшим количеством свободных радикалов из НЖК по сравнению с ненасыщенными [18]. Кроме того, НЖК и этанол стимулируют выделение адипонектина из жировых клеток, а адипонектин ответственен за

защитный эффект насыщенных жиров из-за его благоприятного влияния на метаболизм печеночных жиров и снижение уровня воспалительных цитокинов [18, 19].

Эндогенное и экзогенное обогащение *n*-3 ПНЖК способствует стимулируемому этанолом жировому липолизу за счет повышения активности фосфодиэстеразы 3В и уменьшения накопления цАМФ в адипоцитах. Это связано с активацией рецептора жирных кислот 4 и регуляцией передачи сигналов по пути Ca^{2+} /CaMKK β /AMPK, что в результате блокирует доставку ЖК из жировой ткани к печени, приводя к уменьшению вызванной этанолом дисфункции жировой ткани и повреждения печени [20]. Этанол вызывает деполяризацию митохондрий, которая стимулирует потребление кислорода, приводящее к закрытию анионных каналов наружных мембран митохондрий. Это ингибирует окисление митохондриальных ЖК и высвобождение АТФ, способствуя стеатозу и снижению содержания цитозольного АТФ: избыток ацетил-КоА блокирует β -окисление ЖК, а также усиливает синтез холестерина и тормозит скорость парциальных реакций цикла Кребса, приводя к еще большему депонированию жира в печени [21].

Детализируя эффекты алкоголя, С. Guo et al. показали, что этанол индуцировал биосинтез ЖК, в том числе ненасыщенных, содержание которых прямо коррелировало со стеатозом печени, вызванным этанолом. При этом повышенные уровни стеариновой, олеиновой и линолевой кислот были идентифицированы как биомаркеры АЖБП [22]. По данным А. Hasaba et al., насыщенная стеариновая кислота стимулирует синтез этилового эфира ЖК в клетках HepG2, подвергнутых воздействию этанола [23]. Ненасыщенная олеиновая кислота вызывает ЖБП посредством модуляции белка, связывающего регуляторный элемент стерола 1 [24]. Добавление в пищу линолевой кислоты провоцирует развитие алкогольного повреждения печени [25]. Таким образом, очевидно, что стеариновая, олеиновая и линолевая кислоты, которые являются мишенями для этанола, также могут функционировать в качестве регуляторов развития ЖБП. Кроме того, стеароил-КоА-десатураза может синтезировать олеиновую кислоту из стеариновой кислоты, а ее дефицит защищает от алкогольного повреждения печени, как было показано в модели на мышах [26]. В совокупности корреляции между активацией метаболических путей и фенотипическими изменениями, модуляцией метаболитов и нокаутом генов демонстрируют повышенный синтез ЖК, а биосинтез ненасыщенных ЖК является патологическим метаболическим путем в процессе развития АЖБП [22].

Выраженные изменения в содержании ННЖК у пациентов с АЖБП по данным настоящей работы, вероятно, отражают не только их повышенный синтез, но и нарушенное взаимодействие между компонентами сыворотки крови и мембран эритроцитов, как и снижение механизма обратной связи при их синтезе.

Свободные ЖК, концентрация которых обычно увеличена в плазме больных с НАЖБП, предположительно являются главным фактором, вносящим вклад в воспалительный ответ посредством загрузки Toll-подобных рецепторов и индукции NF- κ B-зависимой продукции воспалительных цитокинов, таких как, TNF- α и IL-6 [27].

Повышение уровня НЖК у пациентов с НАЖБП (маргариновой, стеариновой, арахисовой, пентадекановой) при снижении содержания мононенасыщенных (пальмитолеиновой, элаидиновой, олеиновой) по сравнению как со здоровыми людьми, так и с больными АЖБП, неслучайно. A.K. Leamy et al. показали, что НЖК инициируют клеточную дисфункцию при развитии липотоксичности у пациентов с НАЖБП [28]. Липолиз подкожной и висцеральной жировой ткани ассоциирован с возрастанием концентрации свободных ЖК в крови, что приводит к эктопическому накоплению жира в печени. При попадании в печень свободные ЖК распределяются по трем основным путям удаления липидов: β -окисление, синтез триглицеридов и синтез/ремоделирование фосфолипидов. В ходе митохондриального β -окисления ЖК постепенно расщепляются на двухуглеродные единицы ацетил-КоА, которые впоследствии используются для поддержания цикла трикарбоновых кислот.

Этерификация свободных ЖК в триглицериды и фосфолипиды обеспечивает альтернативный путь для удаления повышенных уровней свободных ЖК. Однако высокие концентрации НЖК предотвращают защитную секвестрацию в хранилища триглицеридов и/или β -окисление, вместо этого они направляются на включение в состав фосфолипидов. ННЖК легко включаются в инертные триглицериды, но избыток НЖК остается в значительной степени неэтерифицированным [29]. Повышенное насыщение фосфолипидов эндоплазматического ретикулума может нарушить целостность структуры его мембраны, что приводит к стимуляции путей передачи сигналов неструктурированных белков и нарушению функции митохондрий. Кроме того, при увеличении содержания НЖК нарушаются этапы цикла трикарбоновых кислот, сопровождаемая гиперпродукцией активных форм кислорода. Как стрессовые метаболические пути эндоплазмати-

ческого ретикулума, так и митохондриальная дисфункция активируют передачу сигналов JNK-стресса, что приводит к возможной апоптотической гибели клеток [28].

Эксперименты *in vitro* с различными типами клеток показали, что чрезмерное воздействие НЖК способствует экспрессии провоспалительных цитокинов, ухудшает передачу сигналов инсулина и стимулирует апоптоз, характеризуемый как нарушениями эндоплазматического ретикулума, так и окислительным стрессом [30–34]. N.M. Borradaile et al. [35] сообщили о быстром истощении запасов кальция эндоплазматического ретикулума в ответ на воздействие пальмитиновой кислотой, что указывает на нарушение активности кальциевой АТФазы мембран, которое ранее ассоциировали с повышенным насыщением фосфолипидных жирных ацильных цепей. Также показано, что пальмитат стимулирует экспрессию активированного p53 модулятора апоптоза посредством JNK1-зависимого механизма [36]. Напротив, мононенасыщенные ЖК способствуют усилению образования стеатотического триглицерида, но не инициируют апоптоз [32, 37].

Для объяснения того, как НЖК инициируют апоптоз в клетках печени, предложено несколько механизмов передачи сигналов, включая гиперпродукцию активных форм кислорода, стресс эндоплазматического ретикулума и усиление синтеза церамидов. В частности, передача сигналов церамидов может служить инициатором печеночного липоапоптоза из-за того факта, что они синтезируются *de novo* из пальмитата и стеарата и способствуют апоптозу в миоцитах [38]. Тем не менее исследования с использованием фармакологических и генетических вмешательств показали, что НЖК могут индуцировать апоптоз независимо от синтеза церамидов в различных типах клеток, включая СНО [37, 38], клетки рака молочной железы [30] и гепатомы H4ПЕС3 [29]. При этом предполагается, что другие механизмы, включающие стресс эндоплазматического ретикулума и накопление активных форм кислорода, могут преобладать в этих тканях.

Повышенная токсичность НЖК при НАЖБП может быть в значительной степени обусловлена тем фактом, что они менее эффективно этерифицируются в триглицериды. Острая липотоксичность НЖК обратно коррелирует с синтезом триглицеридов. Стеароил-КоА-десатураза-1 является ферментом, ответственным за эндогенную десатурацию НЖК, таких как пальмитиновая (C16:0) и стеариновая (C18:0), в их мононенасыщенные аналоги, пальмитолеиновую (C16:1) и олеиновую ЖК (C18:1) соответствен-

но [39, 40]. Изменение способности клеток к насыщению ЖК может резко изменить потенциальные липотоксические эффекты НЖК. Интересно, что модели *in vivo* прогрессирующего заболевания печени у грызунов продемонстрировали значительно подавленный уровень экспрессии стеароил-КоА-десатуразы-1 [41, 42], что свидетельствует о возможном нарушении этерификации НЖК в триглицериды, тем самым вызывая скомпрометированный и/или сниженный синтез последних в качестве триггера прогрессирования НАЖБП. В совокупности приведенные данные свидетельствуют о том, что синтез триглицеридов обеспечивает защитный механизм от токсической аккумуляции свободных ЖК в печени.

В целом литература последних лет указывает на диссоциацию между прогрессированием в сторону тяжелой ЖБП и повышенным образованием триглицеридов в печени. Хотя последнее, несомненно, служит ранним показателем метаболического стресса и заболеваний печени, оно, по-видимому, не является инициирующим фактором при неалкогольном стеатогепатите, а, скорее, служит защитным метаболическим механизмом для противодействия перегрузке свободными ЖК [43]. Триглицериды могут служить в качестве инертных форм хранения липидов для отвлечения ЖК от токсичных путей и, таким образом, защиты клетки от липоапоптотических эффектов. Также продемонстрировано, что степень насыщения ЖК оказывает сильное влияние на тенденцию клетки сохранять их в виде триглицеридов. При этом ненасыщенные ЖК более вероятно включаются в ТГ, а насыщенные направляются по другим метаболическим путям. Как только способность клетки направлять ЖК из других метаболических путей, ведущих к липотоксичности, в нейтральные триглицериды, уменьшается и/или чрезмерно возрастает, содержание ЖК в клетках увеличивается, что приводит к патологическому фенотипу, характерному для неалкогольного стеатогепатита.

По данным настоящего исследования, в мембранах эритроцитов пациентов с НАЖБП выявлен дефицит ПНЖК, особенно *n*-3 докозагексаеновой кислоты. Истощение *n*-3 ПНЖК в печени может способствовать развитию стеатоза посредством повышения экспрессии липогенных генов и ингибирования генов окисления ЖК, вызванных нарушениями при активации PPAR- α и/или снижения доступности стерол-регуляторного элемента, связывающего фактор транскрипции-1, что происходит в условиях низких уровней 20:5*n*-3, 22:5*n*-3 и 22:6*n*-3 и/или их окисленных производных [44, 45]. Эйкозаноидные метаболически активные производные из *n*-6 ПНЖК формируются в больших количествах,

чем таковые из *n*-3 ПНЖК [46], особенно в условиях изменения отношения *n*-6/*n*-3 ПНЖК [47], с последующим избыточным производством простагландинов и лейкотриенов, которые усиливают воспаление.

Сниженное содержание докозагексаеновой кислоты и величина отношения C22:6 *n*-3/C22:5 *n*-6 в мембранах эритроцитов и сыворотке крови по данным настоящего исследования косвенно отражают более высокие уровни докозапентаеновой кислоты *n*-6, в том числе в печени пациентов с НАЖБП, по сравнению с контролем. Известно, что печень не синтезирует значительные количества докозапентаеновой кислоты *n*-6, за исключением случаев дефицита *n*-3 ЖК [48], как это наблюдалось у подопытных животных [49–51] и детей [52, 53]. Эта обратная взаимосвязь между содержанием *n*-3 докозагексаеновой и *n*-6 докозапентаеновой кислот может быть объяснена с точки зрения индукции микросомальной *n*-6-специфической дельта-4 десатуразы, катализирующей биосинтез в печени C22:5*n*-6 из 22:4*n*-6, что вызывается низкими уровнями докозагексаеновой кислоты, которая обычно подавляет фермент [54, 55].

Хотя повышение концентрации *n*-6 докозапентаеновой кислоты при истощении докозагексаеновой ЖК может представлять собой компенсаторный механизм гомеостаза ЖК для поддержания уровня полиненасыщенных фосфолипидов, обеспечивающих адекватную текучесть мембран при дефиците *n*-3 ЖК [49, 51, 56], он, по-видимому, не в полной мере действует при НАЖБП, что подтверждает более низкое содержание общего количества ПНЖК, характерное для эритроцитов у пациентов с НАЖБП в нашей работе и по данным A. Elizondo et al. в печени [57] по сравнению с группой контроля.

Возникает вопрос, играют ли роль дополнительные факторы, регулирующие внутриклеточный метаболизм полиненасыщенных *n*-3 и *n*-6 ЖК, в изменениях в составе ПНЖК-композиций у пациентов с НАЖБП. Вероятно, они могут включать в себя: 1) возможное участие отдельных дельта 6-десатураз, специфичных для длины цепи ЖК [55], 2) изменения парциальных циклов деградации-ресинтеза для 20-, 22- и 24-углеродных ПНЖК [55] и/или 3) изменения экспрессии и активности дельта 6- и 5-десатураз [58] в условиях резистентности к инсулину и окислительного стресса в печени, лежащих в основе развития НАЖБП.

Исследования НАЖБП последних лет показали различное влияние отдельных классов ЖК на протеин NLRP3 инфламмасом, который может функционировать как сенсор для детекции метаболических сигналов опасности у пациен-

тов с НАЖБП. Y.H. Sui et al. показали, что пальмитиновая кислота C16:0 активирует воспаление и индуцирует сенсibilизацию к липополисахарид-индуцированному высвобождению IL-1 β в гепатоцитах [59]. Кроме того, C16:0 «запускает» высвобождение сигналов опасности от гепатоцитов, что зависит от активности каспазы. Напротив, *n*-3 ПНЖК подавляют как индуцированное липополисахаридами возбуждение, так и NLRP3-зависимую инфламматорную активацию в макрофагах и, что важно, *n*-3 ПНЖК предотвращают НАЖБП-индуцированные нарушения, такие как инсулинрезистентность, через ингибирование активации NLRP3 инфламмосом [59, 60].

Таким образом, выявлены различия в уровнях и соотношении ЖК в сыворотке крови и мембранах эритроцитов у пациентов с АЖБП и НАЖБП. Повышенная этерификация ЖК, увеличение синтеза ПНЖК, усиливающих повреждения печени, вызванные этанолом, значимая роль олеиновой и линолевой кислот ассоциированы с АЖБП. Повышение концентрации потенциально липотоксичных насыщенных ЖК у пациентов с НАЖБП (маргариновой, стеариновой, арахисовой, пентадекановой) при снижении моновенасыщенных ЖК (пальмитолеиновой, элаидиновой, олеиновой), *n*-3 докозагексаеновой ПНЖК на фоне компенсаторного увеличения содержания *n*-6 докозапентаеновой ЖК при дефиците *n*-3, повышенный расход *n*-6 ПНЖК предполагают дефектную десатурацию ненасыщенных ЖК и усиление перекисного окисления длинноцепочечных ПНЖК, ассоциированного с окислительным стрессом, особенно, связанные с резистентностью к инсулину. Синтез триглицеридов обеспечивает защитный механизм от токсической аккумуляции свободных ЖК в печени. Корреляции, установленные между уровнем ЖК фосфолипидов эритроцитов и компонентами метаболического синдрома, маркерами потребления алкоголя, а также полученные пилотные диагностические модели, позволяющие различить пациентов с ЖБП и здоровых людей, больных с АЖБП и с НАЖБП, подтверждают, что жирно-кислотные профили мембран эритроцитов, сыворотки крови являются надежными биомаркерами нарушений в метаболизме липидов у пациентов с ЖБП различного генеза и перспективны с точки зрения дифференциальной диагностики.

Работа выполнена в рамках темы «Эпидемиологический мониторинг состояния здоровья населения и изучение молекулярно-генетических и молекулярно-биологических механизмов развития распространенных терапевтических заболеваний в Сибири для совершенствования

подходов к их диагностике, профилактике и лечению» ГЗ № 0324-2018-0001, рег. № АААА-А17-117112850280-2.

ЛИТЕРАТУРА

1. Метаболический синдром. Ред. Г.Е. Ройтберг. М.: МЕД-пресс-информ, 2007. 224 с.
2. Подымова С.Д. Болезни печени. Руководство для врачей. 5-е изд., перераб. и доп. М.: Медицинское информационное агентство, 2018. 984 с.
3. Walsh K., Alexander G. Alcoholic liver disease. *Postgrad. Med. J.* 2000; 76 (895): 280–286.
4. Вовк Е.И. Лечение неалкогольной жировой болезни печени в практике терапевта: Что? Где? Когда? *РМЖ: Рус. мед. журн.* 2011; 11: 1038–1046.
5. Jia Y., Ji P., Nguyen L., French B., Tillman B., French S. Different roles of epigenetic regulators and inflammasome in hepatocellular carcinoma tumorigenesis in patients with ASH vs. NASH. *Exp. Biol.* 2019; A67: 662–667.
6. Радченко В.Г., Шабров А.В., Зиновьева Е.Н., Ситкин С.И. Заболевания печени и желчевыводящих путей: руководство для врачей. СПб.: СпецЛит, 2011. 560 с.
7. Кручинина М.В., Кручинин В.Н., Прудникова Я.И., Громов А.А., Шашков М.В., Соколова А.С. Исследование уровня жирных кислот мембран эритроцитов и сыворотки крови у пациентов с колоректальным раком г. Новосибирска. *Успехи молекуляр. онкологии.* 2018; 5 (2): 50–61.
8. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А. Физиология и патофизиология эритроцита. Томск: Наука, 2004. 202 с.
9. Arab L., Akbar J. Biomarkers and the measurement of fatty acids. *Public Health Nutr.* 2002; (5): 865–871.
10. Zeleniuch-Jacquotte A., Chajes V., Van Kappel A.L., Riboli E., Toniolo P. Reliability of fatty acid composition in human serum phospholipids. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2000; 54: 367–372.
11. Katan M.B., van Birgelen A., Deslypere J.P., Penders M., van Staveren W.A. Biological markers of dietary intake, with emphasis on fatty acids. *Ann. Nutr. Metab.* 1991; 35: 249–252.
12. Osna N.A., Donohue T.M., Jr., Kharbanda K.K. Alcoholic liver disease: Pathogenesis and current management. *Alcohol Res.* 2017; 38 (2): 7–21.
13. Guo C., Chend L., Huang J., Wang Y., Shi C., Gao J., Hong Y., Chen T., Qiu L. Aldose reductase inhibitor protects mice from alcoholic steatosis by repressing saturated fatty acid biosynthesis. *Chem. Biol. Interact.* 2018; 287: 41–48.
14. Fernando H., Bhopale K.K., Boor P.J., Shakeel Ansari G.A., Kaphalia B.S. Hepatic lipid profiling of deer mice fed ethanol using ¹H and ³¹P NMR spectroscopy: a dose-dependent subchronic study. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2012; 264: 361–369.
15. Mezey E. Dietary fat and alcoholic liver disease. *Hepatology.* 1998; 28: 901–905.
16. Nanji A.A. Role of different dietary fatty acids in the pathogenesis of experimental alcoholic liver disease. *Alcohol.* 2004; 34: 21–25.
17. Kirpich I.A., Miller M.E., Cave M.C., Joshi-Barve S., McClain C.J. Alcoholic liver disease: update on the role of dietary fat. *Biomolecules.* 2016; 6: 1–12.

18. Griffith C.M., Schenker S. The role of nutritional therapy in alcoholic liver disease. *Alcohol Res. Health.* 2006; 29 (4): 296–306.
19. Fernando H., Bhopale K.K., Kondraganti S.S., Kaphalia B., Ansari G. Alcohol-induced hepatic steatosis: A comparative study to identify possible indicator(s) of alcoholic fatty liver disease. *J. Drug Alcohol Res.* 2018; 7: 236040(5).
20. Wanga M., Zhanga X., Maa L., Fenga R., Yanb C., Sua H., Hea C., Kangc J.X., Liud B., Wan J. 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.
21. Zhong Z., Lemasters J.J. A Unifying hypothesis linking hepatic adaptations for ethanol metabolism to the proinflammatory and profibrotic events of alcoholic liver disease. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 2018; 42 (11): 2072–2089.
22. Guo C., Ma J., Zhong Q., Zhao M., Hu T., Chen T., Qiu L., Wen L. Curcumin improves alcoholic fatty liver by inhibiting fatty acid biosynthesis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2017; 328: 1–9.
23. Hasaba A., Cluette-Brown J.E., Laposata M. Stearic acid stimulates FA ethyl ester synthesis in HepG2 cells exposed to ethanol. *Lipids.* 2003; 38: 1051–1055.
24. Ziamajidi N., Khaghani S., Hassanzadeh G., Vardasbi S., Ahmadian S., Nowrouzi A., Ghaffari S.M., Abdirad, A. Amelioration by chicory seed extract of diabetes- and oleic acid-induced non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)/non-alcoholic steatohepatitis (NASH) via modulation of PPAR α and SREBP-1. *Food Chem. Toxicol.* 2013; 58: 198–209.
25. Nanji A.A., French S.W. Dietary linoleic acid is required for development of experimentally induced alcoholic liver injury. *Life Sci.* 1989; 44: 223–227.
26. Lounis M.A., Escoula Q., Veillette C., Bergeron K.F., Ntambi J.M., Mounier C. SCD1 deficiency protects mice against ethanol-induced liver injury. *Biochim. Biophys. Acta.* 2016; 1861: 1662–1670.
27. Shi H., Kokoeva M.V., Inouye K., Tzameli I., Yin H., Flier J.S. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 2006; 116: 3015–3025.
28. Leamy A.K., Egnatchik R.A., Young J.D. Molecular mechanisms and the role of saturated fatty acids in the progression of non-alcoholic fatty liver disease. *Prog. Lipid Res.* 2013; 52 (1): 165–174.
29. Noguchi Y., Young J.D., Aleman J.O., Hansen M.E., Kelleher J.K., Stephanopoulos G. Effect of anaplerotic fluxes and amino acid availability on hepatic lipopapoptosis. *J. Biol. Chem.* 2009; 284: 33425–33436.
30. Hardy S., El-Assaad W., Przybytkowski E., Joly E., Prentki M., Langelier Y. Saturated fatty acid-induced apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells – A role for cardiolipin. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 31861–31870.
31. Turpin S., Lancaster G., Darby I., Febbraio M., Watt M. Apoptosis in skeletal muscle myotubes is induced by ceramides and is positively related to insulin resistance. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2006; 291: E1341–E1350.
32. Okere I., Chandler M., McElfresh T., Rennison J.H., Sharov V., Sabbah H.N., Tserng K.Y., Hoit B.D., Ernsberger P., Young M.E., Stanley W.C. Differential effects of saturated and unsaturated fatty acid diets on cardiomyocyte apoptosis, adipose distribution, and serum leptin. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2006; 291: H38–H44.
33. Srivastava S., Chan C. Application of metabolic flux analysis to identify the mechanisms of free fatty acid toxicity to human hepatoma cell line. *Biotechnol. Bioeng.* 2008; 99: 399–410.
34. Pagliassotti M., Wei Y., Wang D. Saturated fatty acids induce cytotoxicity in hepatocytes via effects on the endoplasmic reticulum. *Obesity Res.* 2005; 13: A31–A35.
35. Borradaile N.M., Han X., Harp J.D., Gale S.E., Ory D.S., Schaffer J.E. Disruption of endoplasmic reticulum structure and integrity in lipotoxic cell death. *J. Lipid Res.* 2006; 47: 2726–2737.
36. Cazanave S.C., Mott J.L., Elmi N.A., Bronk S.F., Werneburg N.W., Akazawa Y., Kahraman A., Garrison S.P., Zambetti G.P., Charlton M.R., Gores G.J. JNK1-dependent PUMA expression contributes to hepatocyte lipopapoptosis. *J. Biol. Chem.* 2009; 284: 26591–26602.
37. Listenberger L., Han X., Lewis S., Cases S., Farese R.V., Jr., Ory D.S., Schaffer J.E. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003; 100: 3077–3082.
38. Listenberger L.L., Ory D.S., Schaffer J.E. Palmitate-induced apoptosis can occur through a ceramide-independent pathway. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 14890–14895.
39. Enoch H.G., Catala A., Strittmatter P. Mechanism of rat-liver microsomal steryl-CoA desaturase – Studies of substrate specificity, enzyme substrate interactions, and function of lipid. *J. Biol. Chem.* 1976; 251: 5095–5103.
40. Miyazaki M., Man W.C., Ntambi J.M. Targeted disruption of stearoyl-CoA desaturase 1 gene in mice causes atrophy of sebaceous and meibomian glands and depletion of wax esters in the eyelid. *J. Nutr.* 2001; 131: 2260–2268.
41. Li Z.Z., Berk M., McIntyre T.M., Feldstein A.E. Hepatic lipid partitioning and liver damage in non-alcoholic fatty liver disease – Role of stearoyl-CoA desaturase. *J. Biol. Chem.* 2009; 284: 5637–5644.
42. Rizki G., Arnaboldi L., Gabrielli B., Yan J., Lee G.S., Ng R.K., Turner S.M., Badger T.M., Pitas R.E., Maher J.J. Mice fed a lipogenic methionine-choline-deficient diet develop hypermetabolism coincident with hepatic suppression of SCD-1. *J. Lipid Res.* 2006; 47 (10): 2280–2290.
43. Schaffer J.E. Lipotoxicity: when tissues overeat. *Cur. Opin. Lipidol.* 2003; 14: 281–287.
44. Clarke S.D. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. I. Molecular mechanism for polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2001; 281: G865–G869.
45. Delarue J., Lefoll C., Corporeau C., Lucas D. n-3 long chain polyunsaturated fatty acids: a nutritional tool to prevent insulin resistance associated to type 2 diabetes and obesity. *Reprod. Nutr. Dev.* 2004; 44: 289–299.
46. Simopoulos A.P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed. Pharmacother.* 2002; 56: 365–379.

47. Leonard A.E., Pereira S.L., Sprecher H., Huang Y.S. Elongation of long-chain fatty acids. *Prog. Lipid Res.* 2004; 43: 36–54.
48. Tinoco J., Babcock R., Hincenbergs I., Medwadowski B., Miljanich P. Linolenic acid deficiency: changes in fatty acid patterns in female and male rats raised on a linolenic acid deficient diet for two generations. *Lipids.* 1978; 13: 6–17.
49. Connor W.E., Neuringer M., Lin D.S. Dietary effects on brain fatty acid composition: the reversibility of n-3 fatty acid deficiency and turnover of docosahexaenoic acid in the brain, erythrocytes, and plasma of rhesus monkeys. *J. Lipid Res.* 1990; 31: 237–247.
50. Greiner R.S., Catalan J.N., Moriguchi T., Salem N.Jr. Docosapentaenoic acid does not completely replace DHA in n-3FA-deficient rats during early development. *Lipids.* 2003; 38: 431–435.
51. Moriguchi T., Loewke J., Garrison M., Catalan J.N., Salem N., Jr. Reversal of docosahexaenoic acid deficiency in the rat brain, retina, liver, and serum. *J. Lipid Res.* 2001; 42: 419–427.
52. Makrides M., Neumann M.A., Byard R.W., Simmer K., Gibson R.A. Fatty acid composition of brain, retina, and erythrocytes in breast- and formula-fed infants. *Am. J. Clin. Nutr.* 1994; 60: 189–194.
53. Jamieson E.C., Farquharson J., Logan E.C., Farquharson J., Logan R.W., Howatson A.G., Patrick W.J., Weaver L.T., Cockburn F. Infant cerebellar gray and white matter fatty acids in relation to age and diet. *Lipids.* 1999; 34 (10): 1065–1071.
54. Infante J.P., Huszagh V.A. Analysis of the putative role of 24-carbon polyunsaturated fatty acids in the biosynthesis of docosapentaenoic (22:5n-6) and docosahexaenoic (22:6n-3) acids. *FEBS Lett.* 1998; 431: 1–6.
55. Sprecher H. Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta.* 2000; 1486: 219–231.
56. Lim S.Y., Hoshiba J., Salem N., Jr. An extraordinary degree of structural specificity is required in neural phospholipids for optimal brain function: n-6 docosapentaenoic acid substitution for docosahexaenoic acid leads to a loss in spatial task performance. *J. Neurochem.* 2005; 95: 848–857.
57. Elizondo A., Araya J., Rodrigo R., Poniachik J., Csendes A., Maluenda F., Diaz J.C., Signorini C., Sgherri C., Comporti M., Videla L.A. Polyunsaturated fatty acid pattern in liver and erythrocyte phospholipids from obese patients. *Obesity.* 2007; 15: 24–31.
58. Das U.N. A defect in the activity of Delta6 and Delta5 desaturases may be a factor predisposing to the development of insulin resistance syndrome. Prostaglandins Leukot. *Essent. Fatty Acids.* 2005; 72: 343–350.
59. Sui Y.H., Luo W.J., Xu Q.Y., Hua J. Dietary saturated fatty acid and polyunsaturated fatty acid oppositely affect hepatic NOD-like receptor protein 3 inflammasome through regulating nuclear factor-kappa B activation. *World J. Gastroenterol.* 2016; 22 (8): 2533–2544.
60. Csak T., Ganz M., Pespisa J., Kodys K., Dolganiuc A., Szabo G. Fatty acid and endotoxin activate inflammasomes in mouse hepatocytes that release danger signals to stimulate immune cells. *Hepatology.* 2011; 54 (1): 133–144.

FEATURES OF LIPIDOMIC PROFILE OF ERYTHROCYTE MEMBRANES AND BLOOD SERUM IN PATIENTS WITH FATTY LIVER DISEASE

M.V. Kruchinina¹, M.V. Parulikova¹, S.A. Kurilovich¹, A.A. Gromov¹, M.V. Shashkov²,
A.S. Sokolova³, V.N. Kruchinin⁴

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

²*G.K. Boreskov Institute of Catalysis of SB RAS
630090, Novosibirsk, Academician Lavrent'ev av., 5*

³*N.N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry of SB RAS
630090, Novosibirsk, Academician Lavrent'ev av., 9*

⁴*A.V. Rzhzanov Institute of Semiconductor Physics of SB RAS
630090, Novosibirsk, Academician Lavrent'ev av., 13*

The aim of the work was to study the compositional features of fatty acids of erythrocyte membranes and blood serum in patients with fatty liver disease of alcoholic (AFLD) and nonalcoholic (NAFLD) genesis for possible use for differential diagnosis. A total of 80 men (51.8 ± 3.9 years) with AFLD ($n = 28$) and NAFLD ($n = 52$), as well as 20 conditionally healthy individuals were examined. The composition of erythrocyte membrane and serum fatty acids (FA) was studied using a chromatography mass spectrometry system based on three Agilent 7000B quadrupoles (USA). Differences in levels and ratios of FA in blood serum and erythrocyte membranes were revealed in patients with alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. Increased esterification of FA, increased synthesis of polyunsaturated (PUFA), enhancing liver damage caused by ethanol, a significant role of oleic and linoleic acids are associated with AFLD. Patients with NAFLD showed elevated levels of potentially lipotoxic saturated FA (margarine, stearic, arachinic, pentadecanoic) with a decrease in monounsaturated (palmitoleic, elaidic, oleic). A decrease in the content of docosahexaenoic $n-3$ PUFAs against the background of a compensatory increase in the level of docosapentaenoic FA $n-6$ with an omega-3 deficiency, increased consumption of omega-6 PUFAs suggest defective desaturation of unsaturated fatty acids and increased longchain PUFA peroxidation followed by oxidative stress, especially insulin resistance. The synthesis of triglycerides provides a protective mechanism against toxic accumulation of free FA in the liver. Correlation was established between the levels of FA erythrocyte phospholipids and components of the metabolic syndrome, markers of alcohol consumption. Pilot diagnostic models have been obtained that make it possible to distinguish patients with NAFLD and AFLD from healthy patients (AUC 0.892, sensitivity 0.82, specificity 0.88 for NAFLD; AUC 0.811, sensitivity 0.74, specificity 0.80 for ASFLD), as well as NAFLD from AFLD (AUC 0.790, sensitivity 0.73, specificity 0.78). FA profiles of erythrocyte membranes and blood serum are reliable biomarkers of disorders in lipid metabolism in patients with fatty liver disease of various genesis and are promising from the point of view of differential diagnosis.

Keywords: fatty liver disease, alcoholic, non-alcoholic genesis, fatty acids, red blood cells, blood serum, diagnostics.

*Статья поступила 10 апреля 2020 г.
Принята к печати 5 мая 2020 г.*