



¹ Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины – филиал Федерального исследовательского центра Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск

² Новосибирский государственный медицинский университет

Жирные кислоты мембран эритроцитов и сыворотки крови как биомаркеры для выявления стеатогепатита у пациентов с алкогольной жировой болезнью печени

М.В. Кручинина, д.м.н.^{1,2}, М.Ф. Осипенко, д.м.н., проф.²,
М.В. Паруликова¹, А.А. Громов, к.м.н.¹, Э.В. Кручинина²

Адрес для переписки: Маргарита Витальевна Кручинина, linkruchinina@yandex.ru

Для цитирования: Кручинина М.В., Осипенко М.Ф., Паруликова М.В. и др. Жирные кислоты мембран эритроцитов и сыворотки крови как биомаркеры для выявления стеатогепатита у пациентов с алкогольной жировой болезнью печени. Эффективная фармакотерапия. 2024; 20 (30): 12–23.

DOI 10.33978/2307-3586-2024-20-30-12-23

Цель работы – изучить особенности жирных кислот мембран эритроцитов и сыворотки крови у пациентов с алкогольной жировой болезнью печени (АЖБП) с различной некровоспалительной активностью для выявления биомаркеров стеатогепатита.

Материал и методы. Обследованы 43 мужчины (48,5 ± 8,1 года) с АЖБП с разной степенью некровоспалительной активности по данным AshTest теста: первая группа (n = 23) с минимальной активностью А0–1 (стеатоз), вторая группа (n = 20) – с выраженной активностью А2–3 (стеатогепатит). Исследование состава жирных кислот (ЖК) мембран эритроцитов и сыворотки крови проведено с помощью газовой хроматографии/масс-спектрометрии (Agilent 7000В, США).

Результаты. Уровни арахидоновой кислоты C20:4n-6 (p = 0,000018), суммарное содержание (C20:5n-3 + C22:6n-3) (p = 0,0027), суммарное содержание всех омега-3 полиненасыщенных ЖК (ПНЖК) (p = 0,003), уровни докозагексаеновой C22:6n-3 (p = 0,0046), докозапентаеновой C22:5n-3 (p = 0,0054), докозатетраеновой C22:4n-6 (p = 0,01), эйкозапентаеновой кислоты C20:5n-3 (p = 0,048) в мембранах эритроцитов и этой же кислоты в сыворотке крови (p = 0,0015) оказались статистически значимо выше у пациентов с алкогольным стеатогепатитом. Напротив, концентрации альфа-линоленовой C18:3n-3 (p = 0,0032), гексадекадиеновой C16:2n-6 (p = 0,026), пальмитолеиновой C16:1;9 (p = 0,033), пентадекановой C15:0 (p = 0,04), величины отношений насыщенные ЖК/ПНЖК (p = 0,017), насыщенные ЖК/ненасыщенные ЖК (p = 0,029) были ниже у пациентов с алкогольным стеатогепатитом по сравнению со стеатозом. Использование уровней отдельных ЖК или их суммарного содержания в мембранах эритроцитов обеспечило достаточные уровни диагностической точности в различении степени некровоспалительной активности у пациентов с АЖБП: арахидоновая кислота – AUC 0,940, чувствительность 85,7%, специфичность 84,6%; суммарное содержание ПНЖК – AUC 0,874, чувствительность 78,6%, специфичность 84,6%; докозапентаеновая кислота – AUC 0,876, чувствительность 78,6%, специфичность 76,9%; суммарное содержание (C20:5n-3 + C22:6n-3) – AUC 0,863, чувствительность 71,5%, специфичность 84,6%. Комбинированная «панель», включающая минимальное количество жирных кислот мембран эритроцитов – C20:4n-6, C18:3n-3, НЖК/ПНЖК, обеспечила наиболее высокие уровни диагностической точности – AUC 0,954; 95%-ный доверительный интервал 0,8–1,0, чувствительность 92,7%, специфичность 90,3%.

Заключение. ЖК мембран эритроцитов, сыворотки крови следует рассматривать как перспективные патогенетически обоснованные биомаркеры для выявления пациентов со стеатогепатитом при АЖБП.

Ключевые слова: алкогольная жировая болезнь печени, стеатогепатит, диагностика, жирные кислоты, мембраны эритроцитов, сыворотка крови



Введение

Алкогольная болезнь печени (АБП) – это общий термин для патологий печени, вызванных потреблением алкоголя, включая жировую дистрофию печени, алкогольный гепатит и цирроз печени, которые могут в дальнейшем прогрессировать до развития гепатоцеллюлярной карциномы. Важно отметить, что клинически значимая АБП развивается только у части людей, злоупотребляющих алкоголем. Алкогольный гепатит встречается примерно у 10–35% систематически пьющих, тяжелый алкогольный гепатит является причиной смертности, приближающейся к 35–45%. Примерно у 10–20% алкоголиков развивается цирроз печени [1]. На сегодняшний день стратегии профилактики и лечения АБП недостаточно эффективны, отчасти из-за отсутствия знаний о молекулярных механизмах, лежащих в основе развития и прогрессирования данной патологии. Алкогольная жировая болезнь печени (АЖБП) является наиболее распространенным заболеванием, ассоциированным с систематическим потреблением алкоголя в токсических дозах, и при воздержании от приема алкоголя полностью обратимым [2]. Прогрессирование АЖБП связано с наличием активного воспаления в ткани печени, поэтому выявление пациентов с алкогольным стеатогепатитом является наиболее актуальным [3]. Золотым стандартом для верификации активного некровоспалительного процесса в печени является биопсия с последующим гистологическим исследованием [4], однако инвазивность процедуры, необходимость показаний для ее проведения, вероятность осложнений, «ошибки взятия образца» ограничивают использование биопсии в клинической практике для верификации стеатогепатита [5].

Существующие методы визуализации, включая ультразвуковое исследование печени, компьютерную томографию, магнитно-резонансную томографию, САР-функцию при выполнении транзитной эластометрии печени, не позволяют отличить стеатоз от стеатогепатита, который обычно характеризуется не только накоплением липидов, но и баллонной дистрофией гепатоцитов и лобулярным воспалением [6].

Активность аминотрансфераз как показатель воспаления в ткани печени имеет существенные ограничения при алкогольной жировой болезни печени, поскольку у части пациентов со стеатогепатитом она находится в пределах референсных значений [7]. В то же время повышенные уровни активности АЛТ, АСТ в ранние сроки абстиненции могут отражать факт систематического потребления алкоголя, а не активное воспаление в ткани печени [8]. Сывороточные тесты на основании изменения биохимических показателей позволяют косвенно оценить наличие стеатогепатита и его степень при АЖБП, в частности AshTest в составе FibroMax [9], однако уровни ряда параметров (альфа-2-макроглобулина, аполипопротеина А1) могут быть повышены в связи с активным воспалением в других органах, значения гаптоглобина изменяются вследствие гемолиза, вероятного при алкогольном поражении печени, а активность ГГТП может быть ассоциирова-

на с систематическим потреблением алкоголя, а не с некровоспалительным процессом в печени [10].

Одним из факторов, приводящих к прогрессированию жировой болезни печени, является токсическое действие свободных жирных кислот, уровень которых в определенной степени коррелирует с жирно-кислотным профилем мембран эритроцитов [11]. Чрезмерное накопление триглицеридов и других видов липидов связано с нарушением регуляции потока липидов в печени, заключающимся в повышенном гепатоцеллюлярном поглощении, синтезе и деградации липидов (то есть окислении жирных кислот), индуцированном потреблением этанола при АБП [12]. На мышинных моделях АБП показано увеличение экспрессии SREBP1c (ключевого фактора транскрипции в печеночном липогенезе) [13], что приводит к повышению экспрессии печеночных липогенных генов и нарастанию липогенеза *de novo*. По данным исследований, проведенных на людях [14, 15], установлена повышенная активность ацетил-CoA-карбоксилазы, ассоциированная с липогенезом *de novo*, и сниженная – карнитинпальмитоилтрансферазы (фермента, лимитирующего митохондриальное β -окисление, регулирующего деградацию липидов) [16]. Накопление насыщенных жирных кислот, а также других патогенных липидов, таких как церамиды, диацилглицерины и лизофосфатидилхоллин, среди прочих факторов способствует развитию липотоксичности – явления, которое определяется возникновением клеточной дисфункции и смерти клетки [17]. Следует отметить, что при АБП феномен липотоксичности недостаточно изучен, а информация о природе внутривнутрипеченочных видов липидов и их клеточных эффектах ограничена [14].

Цель исследования – изучить особенности жирных кислот мембран эритроцитов и сыворотки крови у пациентов с алкогольной жировой болезнью печени с различной некровоспалительной активностью для выявления биомаркеров стеатогепатита.

Материал и методы

Дизайн исследования – сравнительное нерандомизированное открытое исследование серии случаев. Обследованы 43 мужчины ($48,5 \pm 8,1$ года) с жировой болезнью печени (ЖБП) по данным ультразвукового исследования органов брюшной полости [18]. Диагноз был подтвержден значениями индекса стеатоза печени FLI (Fatty liver index), превышающими 60.

В настоящей работе использован термин «алкогольная болезнь печени» (АБП), что соответствовало кодам K70.0 Алкогольная жировая дистрофия печени (стеатоз) и K70.1 Алкогольный гепатит по МКБ-10 [19].

Алкогольный генез ЖБП устанавливали по данным подтвержденного систематического потребления алкоголя в настоящее время и в анамнезе (по данным стандартного опроса, в том числе с помощью CAGE-опросника, AUDIT (Alcohol Use Disorders Inventory Test) > 8 баллов), при обнаружении стигм алкогольного поражения печени, повышении активности ГГТП, коэффициента де Ритиса > 1 (АСТ/АЛТ) [19]. Согласно новой классификации по жировой болезни печени,



при установлении алкогольного генеза ЖБП учитывались разовая доза потребляемого алкоголя в пересчете на чистый этанол (> 60 г) и недельная (> 420 г) [2]. Пациенты с АЖБП были обследованы на 13,1 \pm 2 день абстиненции, при этом последняя принятая доза алкоголя составила 96,2 \pm 5,6 г в пересчете на чистый этанол (от 40 до 200 г).

У пациентов были исключены жировая болезнь печени, ассоциированная с метаболическим синдромом, вирусные гепатиты, генетически детерминированные заболевания, ассоциированные с ЖБП, аутоиммунный, лекарственный гепатит, парентеральное питание в анамнезе.

Степень некровоспалительной активности в печени определена с помощью алгоритма AshTest (альфа-2-макроглобулин, гаптоглобин, аполипопротеин А1, общий билирубин, ГГТП, триглицериды и глюкоза натощак с поправкой на возраст и пол) в составе FibroMax (BioPredictive, Франция). Пациенты были разделены на две группы: первая группа с минимальной некровоспалительной активностью (A0–1, n = 23) – пациенты со стеатозом печени; вторая группа с выраженной некровоспалительной активностью (A2–3, n = 20) – пациенты со стеатогепатитом.

Обследование пациентов с ЖБП включало сбор анамнеза, клинико-лабораторные и инструментальные исследования для оценки состояния заболевания по клиническим показаниям. У всех обследованных методом непрямой эластометрии на аппарате FibroScan® 502 (Echosens, Франция) определена степень выраженности фиброза печени, которая не превышала первую. Исследование состава ЖК мембран эритроцитов и сыворотки крови проведено с помощью газовой хроматографии/масс-спектрометрии с использованием системы на основе трех квадрупольных Agilent 7000B (США). Концентрации ЖК выражали в относительных процентах. Предел обнаружения ЖК ~ 1 мкг на образец [20]. Кроме содержания отдельных ЖК, определяли суммарное содержание насыщенных жирных кислот (НЖК), ненасыщенных жирных кислот (ННЖК), полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), омега-3 ПНЖК, омега-6 ПНЖК и их соотношения.

При выполнении статистической обработки данных определяли характер распределения количественных признаков методом Колмогорова–Смирнова. В случае нормального распределения вычисляли среднее значение (M) и стандартное квадратичное отклонение (M \pm SD). При сравнении двух нормально распределенных выборок использовали t-тест Стьюдента. При отсутствии нормального распределения вычисляли медиану (Me), 25 и 75 % перцентили (Me [25 %; 75 %]), достоверность различия показателей оценивали с помощью непараметрических критериев (U-критерий Манна – Уитни, хи-квадрат). Для оценки статистической значимости различий относительных показателей использован критерий χ^2 Пирсона. Для определения потенциальных биомаркеров стеатогепатита проведена процедура нормализации концентрации ЖК по медиане с последующим применением методов непарной статистики с использованием Volcano plot

и дискриминантного анализа на основе ортогональных частичных наименьших квадратов (Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis, OPLS-DA). Оценка диагностической точности произведена с помощью ROC-анализа. Рассчитана чувствительность, специфичность и площадь под ROC-кривой (AUC). Использовали программное обеспечение MATLAB (R2019a, MathWorks) [21]. 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 обследованные дали информированное согласие на участие в работе в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266.

Результаты

Клинико-биохимические показатели пациентов исследуемых групп представлены в табл. 1. Пациенты со стеатозом и стеатогепатитом были сопоставимы по возрасту, индексу массы тела. Большая часть мужчин обеих групп систематически с частотой более раза в неделю употребляли алкоголь преимущественно в виде крепких алкогольных напитков с разовой и недельной дозами, соответствующими дозам с высоким риском поражения печени [19]. Пациенты с разной некровоспалительной активностью не различались между собой по стилю и стажу потребления алкоголя. Эластичность печени при исследовании методом непрямой эластометрии также была сопоставима в группах со стеатозом и стеатогепатитом. Активность трансаминаз, как и ГГТП, в обеих группах незначительно превышала уровень референтных значений, статистически значимых различий по активности ферментов в группах не выявлено, что не позволило использовать данные параметры для дифференцирования стеатогепатита от стеатоза. Уровень коэффициента де Ритиса, превышающий 1, косвенно свидетельствовал о систематическом потреблении алкоголя [19], без различий между пациентами со стеатозом и стеатогепатитом. Уровень общего и прямого билирубина оказался несколько повышенным в обеих группах, не различаясь между ними. Уровни общего белка, альбумина, находящиеся в пределах референтных значений, подтверждали сохранность белоксинтетической функции печени. У пациентов обеих групп выявлена гипертриглицеридемия, повышение уровня ХС ЛПВП, косвенно отражающие хроническую алкоголизацию. Вместе с тем показатели липидного профиля в группах были сопоставимы. Таким образом, пациенты со стеатозом и стеатогепатитом не различались по основным клинико-биохимическим показателям, имели минимальную биохимическую активность жировой болезни печени, перечень



Таблица 1. Клинико-инструментальная характеристика групп обследуемых пациентов с алкогольной жировой болезнью печени с разной степенью некрвоспалительной активности, ($M \pm SD$), Me [25%, 75%]

Показатель	Пациенты с АЖБП со стеатозом (n = 23)	Пациенты с АЖБП со стеатогепатитом (n = 20)	p
Возраст, лет	48,9 ± 8,2	50,1 ± 9,3	> 0,1
ИМТ, кг/м ²	24,5 [22,2; 25,9]	25,1 [23,0; 26,3]	> 0,1
Эластичность печени, кПа	6,5 [5,9; 7,1]	7,0 [6,4; 7,5]	> 0,1
Разовая доза потребления алкоголя (г чистого этанола)	75 [50; 80]	80 [65; 89]	> 0,1
Недельная доза потребления алкоголя (г чистого этанола)	432 [350; 491]	448 [380; 500]	> 0,1
Стаж потребления алкоголя, лет	12,9 ± 8,1	13,5 ± 9,8	> 0,1
Общий белок, г/л	70 [66; 72]	69 [67; 71]	> 0,1
Альбумин, г/л	43 [41; 45]	42 [40; 44]	> 0,1
АЛТ, Ед/л	40,5 [35; 55]	42 [37; 59]	> 0,1
АСТ, Ед/л	54,1 [37; 59]	55,8 [40; 60,4]	> 0,1
Коэффициент де Ритиса (АСТ/АЛТ)	1,10 [0,95; 1,4]	1,18 [0,98; 1,5]	> 0,1
ГГТП, Ед/л	55 [45,8; 60,1]	57 [50; 65]	> 0,1
Общий билирубин, мкмоль/л	23,1 [18,8; 27,1]	25,3 [17; 29]	> 0,1
Прямой билирубин мкмоль/л	5,5 [4,5; 6,6]	5,8 [4,9; 6,9]	> 0,1
Железо сыворотки, мкмоль/л	18,7 [14,2; 20]	19 [15; 23]	> 0,1
Общий холестерин, ммоль/л	5,0 [4,6; 5,6]	5,5 [4,9; 6,1]	> 0,1
Триглицериды, ммоль/л	1,9 [1,5; 2,3]	2,0 [1,6; 2,5]	> 0,1
Холестерин ЛПВП, ммоль/л	1,2 [1,0; 1,3]	1,2 [1,1; 1,4]	> 0,1
Холестерин ЛПНП, ммоль/л	3,0 [2,7; 3,5]	3,1 [2,5; 3,8]	> 0,1

повышенных параметров, косвенно подтверждающих систематическое потребление алкоголя.

На первом этапе статистической обработки произведена процедура нормализации уровней жирных кислот мембран эритроцитов, сыворотки крови (рис. 1).

При проведении дискриминантного ортогонального анализа методом частичных наименьших квадратов (orthoPLSDA) установлено наличие жирных кислот мембран эритроцитов и сыворотки крови, уровни которых различались у пациентов с минимальной и выраженной некрвоспалительной активностью (рис. 2).

По результатам анализа с использованием метода Volcano plot (среднее центрирование, непарная статистика) установлен перечень жирных кислот мембран эритроцитов и сыворотки крови, дискриминирующих минимальную и выраженную некрвоспалительную активность, у пациентов с АЖБП (рис. 3, табл. 2).

В соответствии с данными табл. 2 уровни арахидоновой кислоты C20:4n-6 ($p=0,000018$), суммарное содержание (C20:5n-3 + C22:6n-3) ($p=0,0027$), суммарное содержание всех омега-3 ПНЖК ($p=0,003$), уровни докозагексаеновой C22:6n-3 ($p=0,0046$), докозапентаеновой C22:5n-3 ($p=0,0054$), докозатетраеновой C22:4n-6 ($p=0,01$), эйкозапентаеновой кислоты C20:5n-3 ($p=0,048$) в мембранах эритроцитов и этой же кислоты в сыворотке крови ($p=0,0015$) оказались статистически значимо выше при высокой некрвоспалительной активности у пациентов с АЖБП. Напротив, концентрации альфа-линоленовой C18:3n-3 ($p=0,0032$), гексадекадиеновой C16:2

n-6 ($p=0,026$), пальмитолеиновой C16:1;9 ($p=0,033$), пентадекановой кислот C15:0 ($p=0,04$), величины отношений НЖК/ПНЖК ($p=0,017$), НЖК/ННЖК ($p=0,029$) были ниже у пациентов с алкогольным стеатогепатитом по сравнению со стеатозом.

На рис. 4 представлено ранжирование вклада жирных кислот мембран эритроцитов и сыворотки крови в различение стеатогепатита и стеатоза при АЖБП. При проведении ROC-анализа уровни отдельных жирных кислот из вышеуказанного перечня оказались перспективными в дифференцировании степени некрвоспалительной активности у пациентов с АЖБП (рис. 5).

Использование уровней отдельных жирных кислот или их суммарного содержания в мембранах эритроцитов обеспечило достаточные уровни диагностической точности в различении степени некрвоспалительной активности у пациентов с АЖБП: арахидоновая кислота C20:4n-6 – AUC 0,940; 95% ДИ 0,835–0,995, чувствительность 85,7%, специфичность 84,6%; суммарное содержание ПНЖК – AUC 0,874; 95% ДИ 0,731–0,978, чувствительность 78,6%, специфичность 84,6%; докозапентаеновая кислота C22:5n-3 – AUC 0,876; 95% ДИ 0,709–0,978, чувствительность 78,6%, специфичность 76,9%; суммарное содержание (C20:5n-3 + C22:6n-3) – AUC 0,863; 95% ДИ 0,665–0,978, чувствительность 71,5%, специфичность 84,6%. Модель, включающая минимальное количество жирных кислот мембран эритроцитов – C20:4n-6, C18:3n-3, НЖК/ПНЖК, обеспечила наиболее высокие уровни диагностической точности – AUC 0,954; 95% ДИ 0,8–1,0, чувствительность 92,7%, специфичность 90,3%.

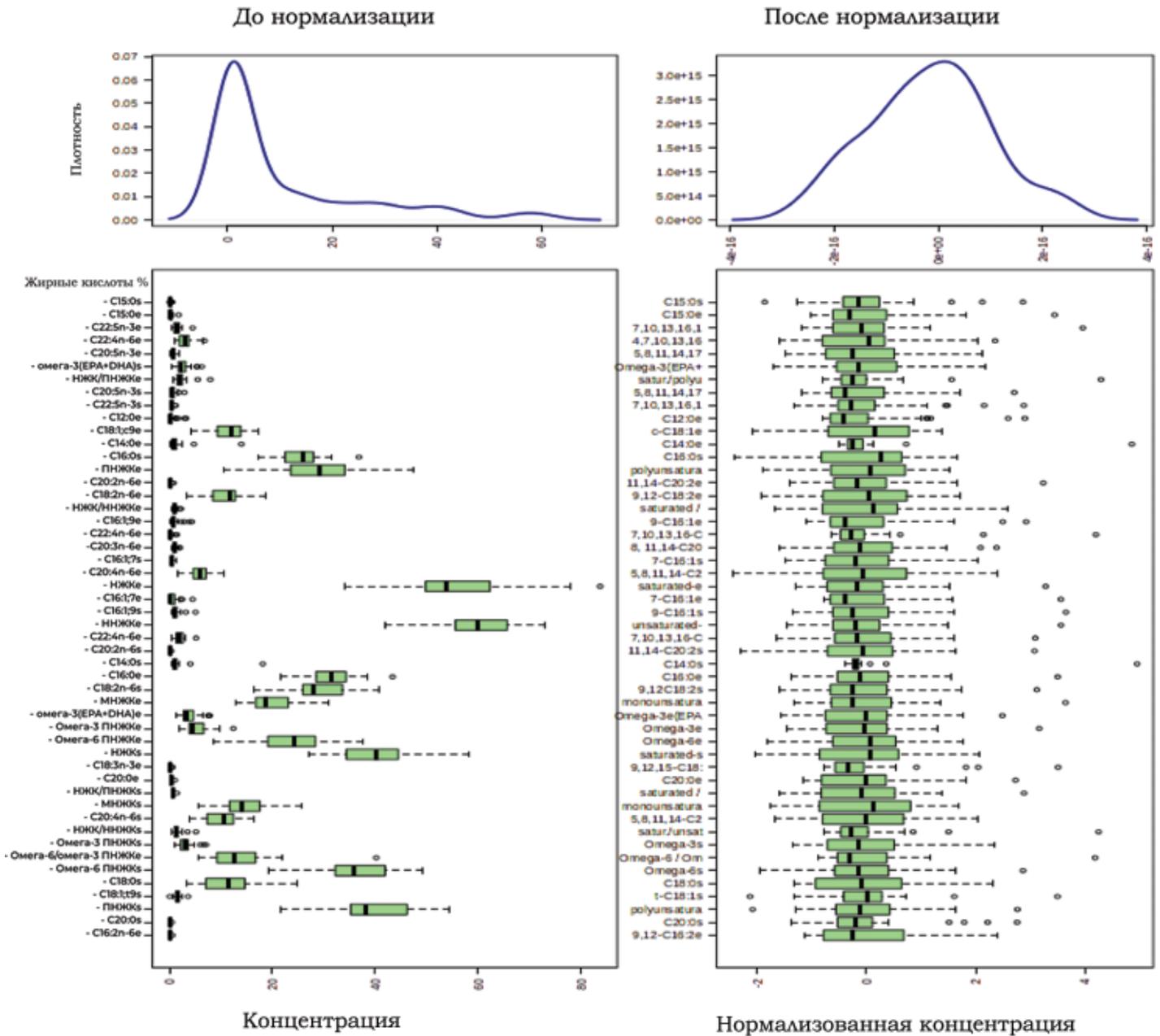


Рис. 1. Нормализация уровней жирных кислот мембран эритроцитов и сыворотки крови пациентов с АЖБП с разной некрвоспалительной активностью

Обсуждение

В настоящем исследовании выявлены жирные кислоты, преимущественно мембран эритроцитов, которые достаточно точно дифференцировали степень некрвоспалительной активности у пациентов с алкогольной жировой болезнью печени. Поскольку в группах со стеатогепатитом и стеатозом биохимическая активность оказалась минимальной, сопоставимой в обеих группах, уровни трансаминаз не помогли в различении степени некрвоспалительной активности. С учетом множества функций жирных кислот, не вызвало удивления то, что их перечень оказался пер-

спективным в качестве биомаркеров для выявления пациентов со стеатогепатитом с более высоким риском прогрессирования. Любопытно, что выраженная некрвоспалительная активность в ткани печени оказалась ассоциированной не только с повышенным уровнем омега-6 ПНЖК, таких как арахидоновая C20:4 n-6, докозатетраеновая C22:4n-6, традиционно связываемых с воспалением и синтезом провоспалительных простагландинов, лейкотриенов, эндоканнабиоидов (2-AG, AEA), липоксинов (LXA₄, LXB₄) [22], но и рядом омега-3 ПНЖК. При этом снижение соотношений НЖК/ННЖК, НЖК/ПНЖК, связанное



с уменьшением содержания насыщенных и увеличением ненасыщенных жирных кислот, также коррелировало с выраженной некровоспалительной активностью у пациентов с АЖБП.

Следует отметить, что позитивное влияние пищевых насыщенных жиров и негативное воздействие пищевых ненасыщенных жиров (в первую очередь обогащенных линолевой кислотой) на вызванное алкоголем повреждение печени было задокументировано на экспериментальных моделях АБП на животных, что авторы связали с усилением альфа-зависимого окисления жирных кислот печени, активируемого пролифератором пероксисом (PPAR α), и снижением восприимчивости мембран гепатоцитов к атаке свободных радикалов [23, 24]. Показано, что у крыс, которых кормили этанолом и рыбьим жиром, содержащим высокий уровень ПНЖК, в том числе омега-3 ПНЖК, развились жировая дистрофия печени, некроз и воспаление более выраженные, чем у крыс, рацион которых включал этанол и кукурузное масло, богатое омега-6 ПНЖК – линолевой [25]. Важно отметить, что пищевая добавка с насыщенными жирами (пальмовое масло) обратила вспять развившуюся экспериментальную алкогольную болезнь печени у крыс и улучшила гистологические изменения ткани печени, несмотря на продолжающееся внутрижелудочное введение этанола [26]. Более того, сравнение потребления жиров с пищей в различных странах с аналогичным потреблением алкоголя на душу населения показало, что потребление насыщенных жиров с пищей было связано с более низким уровнем смертности, тогда как высокий уровень пищевых ненасыщенных

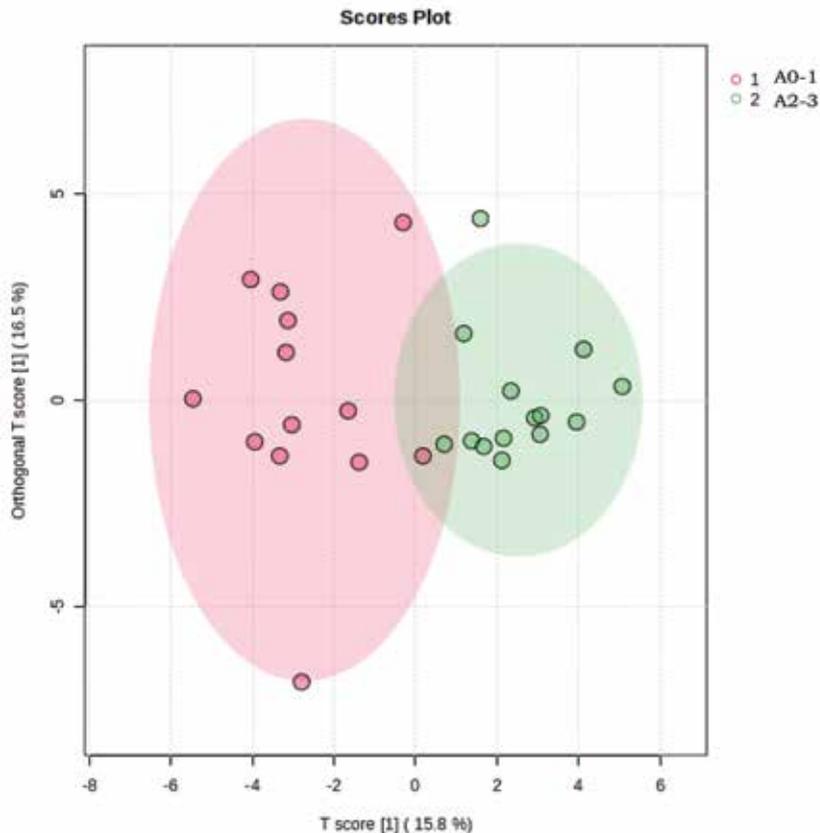


Рис. 2. Дискриминантный ортогональный анализ методом частичных наименьших квадратов (orthoPLSDA) у пациентов с АЖБП с разным уровнем некровоспалительной активности: 1 – минимальная некровоспалительная активность (A0-1); 2 – выраженная некровоспалительная активность (A2-3)

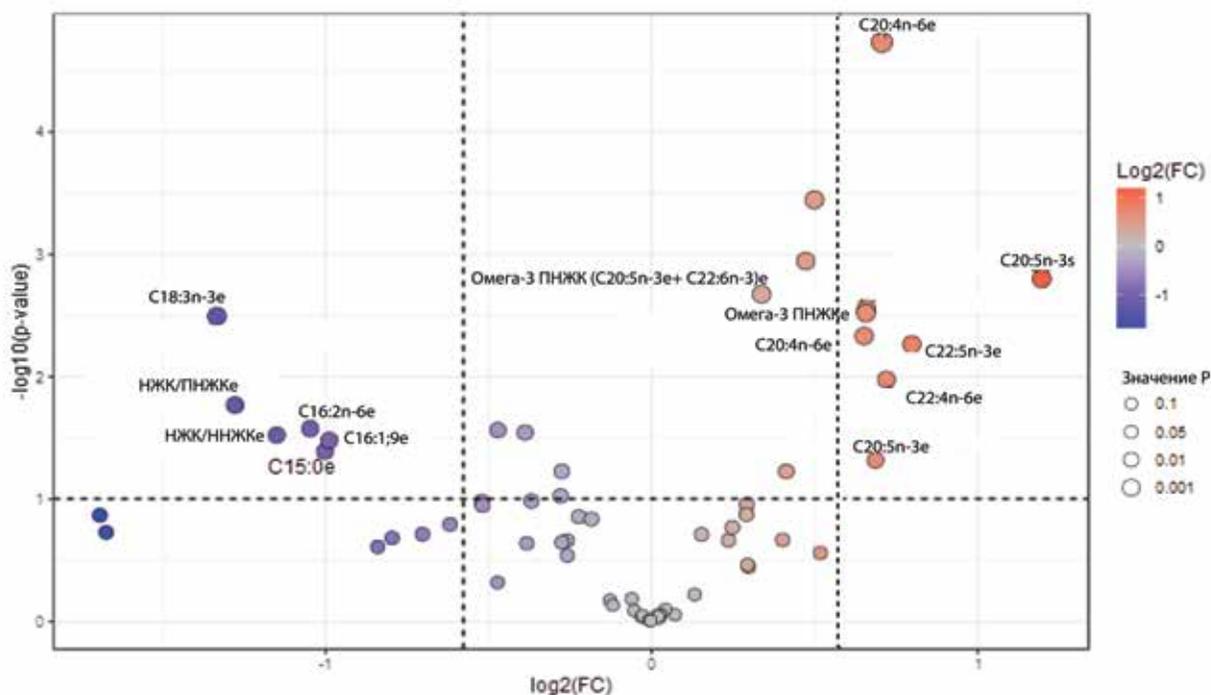


Рис. 3. График распределения уровней жирных кислот мембран эритроцитов и сыворотки крови пациентов с АЖБП в зависимости от уровня некровоспалительной активности при проведении анализа методом Volcano plot



Таблица 2. Жирные кислоты мембран эритроцитов и сыворотки крови – потенциальные биомаркеры для различения стеатогепатита и стеатоза у пациентов с жировой болезнью печени алкогольного генеза (данные получены при использовании Volcano plot, непарная статистика)

Жирные кислоты	Кратность изменений (FC)	$\log_2(FC)$	Значения p (raw. p val.)	$-\log_{10}(p)$
Эритроцитарная арахидоновая кислота C20:4n-6	1,6315	0,70624	1,8483e-05	4,7332
Сывороточная эйкозапентаеновая кислота C20:5n-3	2,2912	1,1961	0,0015843	2,8002
Эритроцитарные (C20:5n-3+ C22:6n-3)	1,5779	0,65801	0,0027927	2,554
Сумма омега-3 ПНЖК мембран эритроцитов	1,5766	0,65685	0,003019	2,5201
Эритроцитарная альфа-линоленовая кислота C18:3n-3	0,39686	-1,3333	0,0032015	2,4947
Эритроцитарная докозагексаеновая кислота C22:6n-3	1,5708	0,65148	0,0046501	2,3325
Эритроцитарная докозапентаеновая кислота C22:5n-3	1,7382	0,79756	0,0054378	2,2646
Эритроцитарная докозатетраеновая кислота C22:4n-6	1,6473	0,72008	0,010543	1,977
НЖК/ПНЖК мембран эритроцитов	0,41254	-1,2774	0,017028	1,7688
Эритроцитарная гексадекадиеновая кислота C16:2 n-6	0,48394	-1,0471	0,026577	1,5755
НЖК/ННЖК мембран эритроцитов	0,45076	-1,1496	0,029946	1,5237
Эритроцитарная пальмитолеиновая кислота C16:1;9	0,50387	-0,98889	0,033124	1,4799
Эритроцитарная пентадекановая кислота C15:0	0,49926	-1,0021	0,040764	1,3897
Эритроцитарная эйкозапентаеновая кислота C20:5n-3	1,6092	0,68639	0,048061	1,3182

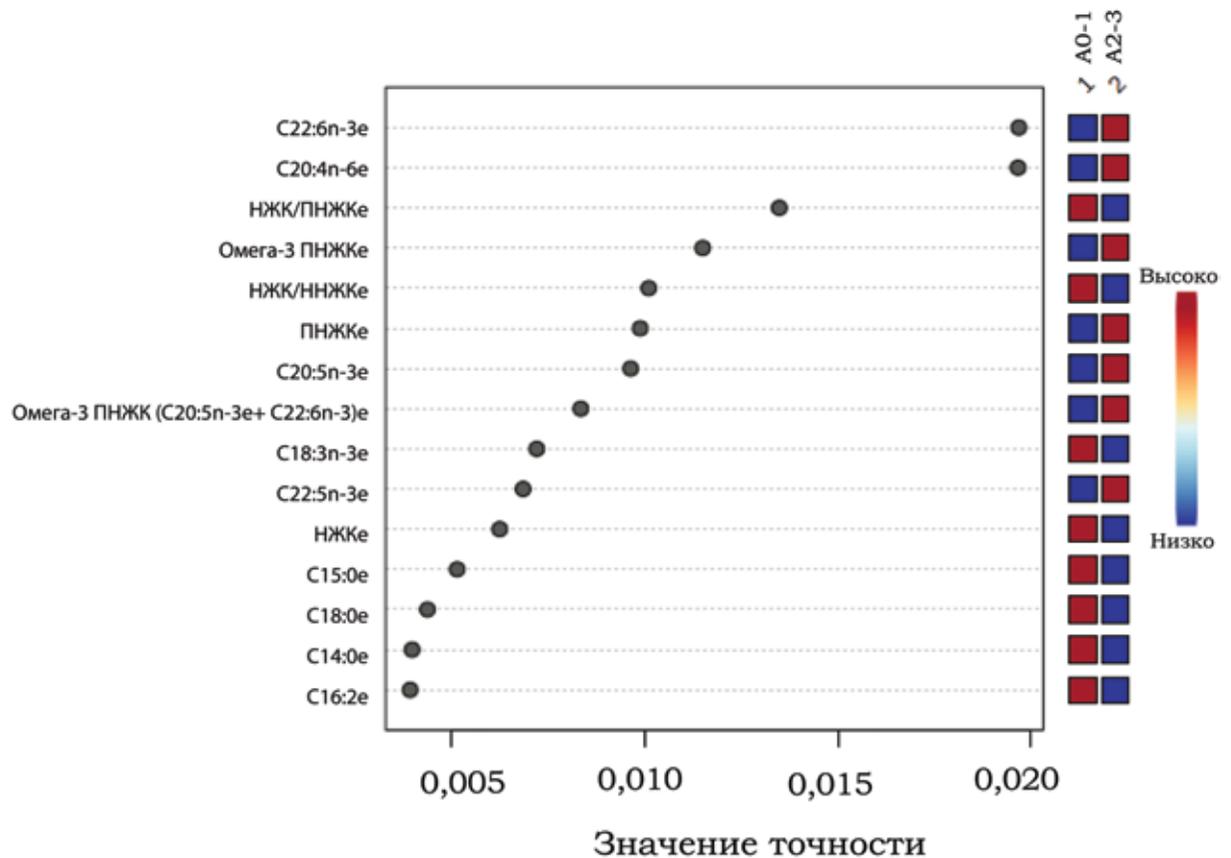


Рис. 4. Ранжирование вклада уровней жирных кислот мембран эритроцитов и сыворотки крови в различении стеатогепатита и стеатоза у пациентов с АЖБП

липидов ассоциирован с более высокой смертностью от алкогольного цирроза печени [27]. Предполагалось, что негативные эффекты ненасыщенных ЖК по сравнению с защитными эффектами насыщенных ЖК при потреблении алкоголя

опосредуются индукцией перекисного окисления липидов и окислительного стресса, повышенным уровнем эндотоксинов и связанной с этим повышенной продукцией провоспалительных цитокинов [28].

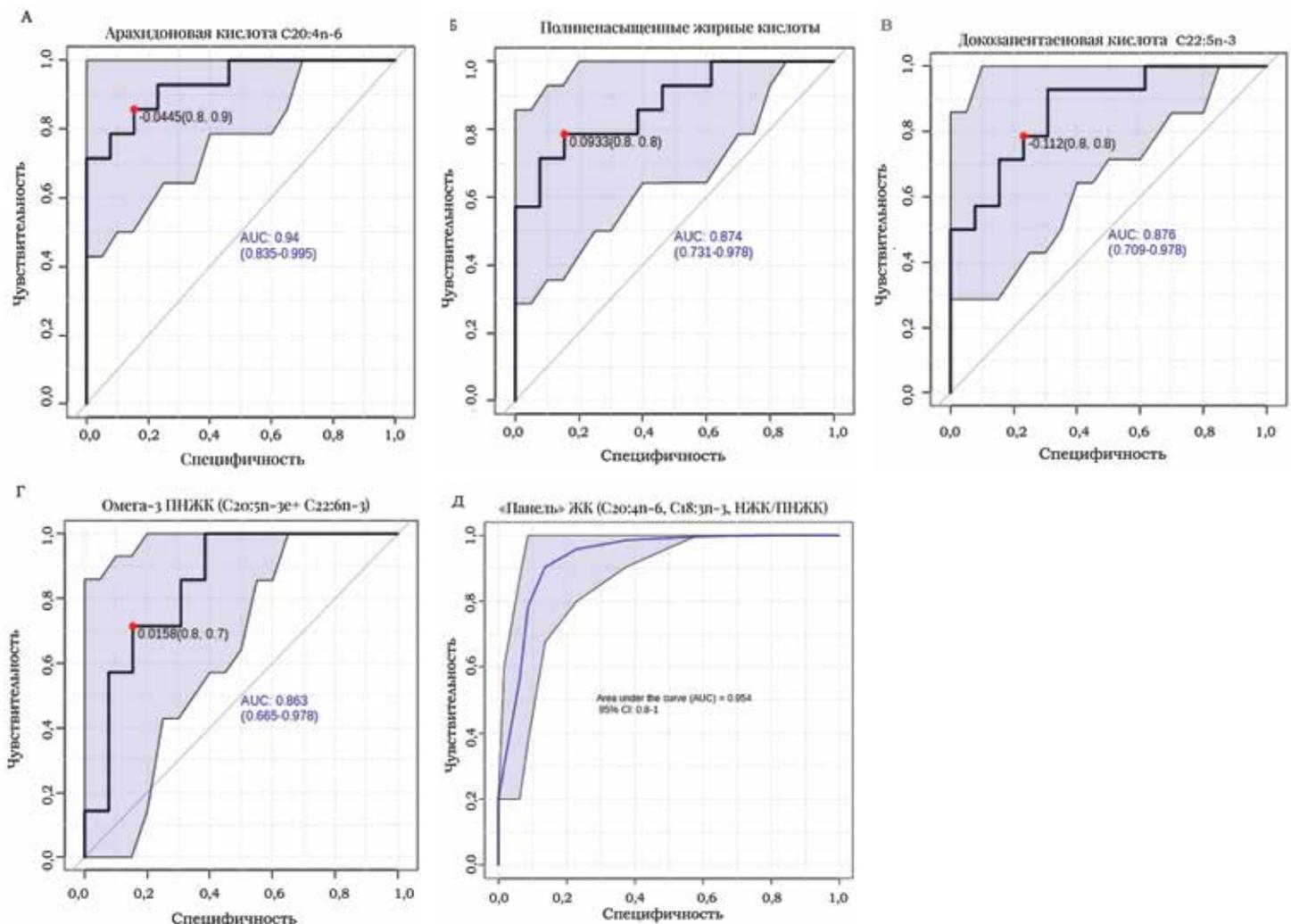


Рис. 5. ROC-кривые с использованием уровней отдельных жирных кислот мембран эритроцитов и их суммарного содержания в различении стеатогепатита и стеатоза у пациентов с АЖБП: А – арахидоновая кислота C20:4n-6 (AUC 0,940; 95% ДИ 0,835–0,995); Б – суммарное содержание ПНЖК (AUC 0,874; 95% ДИ 0,731–0,978); В – докозапентаеновая кислота C22:5n-3 (AUC 0,876; 95% ДИ 0,709–0,978); Г – суммарное содержание (C20:5n-3+ C22:6n-3) (AUC 0,863; 95% ДИ 0,665–0,978); Д – «панель» жирных кислот (C20:4n-6, C18:3n-3, НЖК/ПНЖК) (AUC 0,954; 95% ДИ 0,8–1,0)

Показано, что благоприятное воздействие диетических насыщенных жиров (какао-масла) при АБП было связано с модуляцией печеночной оси SIRT1-SREBP-1 – гистон H3 (сиртуин-стерол, связывающий белок регуляторного элемента-1 – гистон H3), что приводило к подавлению генов, кодирующих липогенные ферменты [29], и индукции адипонектина – гормона адипоцитов, который, как известно, играет благоприятную роль при АБП [30]. Увеличение циркулирующего адипонектина связано с активацией перечня сигнальных путей печени, опосредованных AMP-активируемой протеинкиназой, PPARα и активируемым пролифератором пероксисом рецептором гамма-коактиватора 1-альфа (PGC-1α), что, в свою очередь, приводило к увеличению скорости окисления жирных кислот, профилактике стеатоза печени и снижению активности трансаминаз [30]. Другим недавно выяв-

ленным механизмом влияния липидов на развитие и прогрессирование АБП является ядерный фактор гепатоцитов-4α (HNF4α), главный транскрипционный фактор в регуляции липидного обмена. Сообщалось, что этанол и ненасыщенные жирные кислоты (кукурузное масло), но не насыщенные, приводили к увеличению накопления жира в печени у крыс параллельно со снижением уровней HNF4α. Авторы предположили, что диетические насыщенные ЖК ослабляют вызванное алкоголем накопление липидов в печени, по крайней мере частично, вследствие предотвращения снижения уровня HNF4α [31]. Кроме того, опосредованное этанолом снижение уровня HNF4α в кишечнике было связано с уменьшением содержания белков плотных контактов (ТJ) и нарушением целостности кишечного барьера [32]. Нарушение целостности кишечного барьера является одной из нескольких при-



чин алкогольной эндотоксемии – фактором, способствующим развитию и прогрессированию АБП. Уровни мРНК печеночных Толл-подобных рецепторов (TLR 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9) были значительно увеличены по сравнению с контролем в печени животных, получавших ННЖК + этанол, но не в печени группы животных, получавших НЖК + этанол. Одновременно с повреждением печени наблюдалось значительное повышение проницаемости кишечника и повышенная эндотоксемия в ответ на ННЖК + этанол, но не на НЖК + этанол [33]. Воспаление в стенке кишечника положительно коррелировало с вызванным ННЖК + этанол нарушением работы кишечных белков плотных контактов TJs. Кроме того, ННЖК + этанол, но не НЖК + этанол, приводили к изменениям слоя кишечной слизи и антимикробной защиты кишечника [34].

Данные о роли омега-3 ПНЖК при АБП противоречивы. Было показано, что диета, содержащая рыбий жир, особенно рыбий жир американской сельди, способствует тяжелому повреждению печени и воспалению в экспериментальной модели на крысах, получавших этанол [35]. Эти эффекты были объяснены значительно повышенным уровнем печеночного цитохрома P450 2E1 (CYP2E1) и усиленным перекисным окислением липидов. Исследования *in vitro* показали различный эффект основных омега-3 ПНЖК на поврежденные этанолом гепатоциты, при более значительном их влиянии на липидные рафты [36, 37]. Показано, что эйкозапентаеновая кислота способствовала ремоделированию мембран путем транслокации фосфолипазы C (PLC) в липидные рафты, усиливая окислительный стресс и гибель клеток, вызванную этанолом, которые можно уменьшить витамином E и стабилизаторами мембран [36]. Напротив, докозагексаеновая кислота предотвращала вредное воздействие этанола на гепатоциты, ингибируя перемещение PLC в липидные рафты [37]. Окислительный стресс вызывал перекисное окисление липидов мембран, нарушал функцию митохондрий и снижал антиоксидантную ферментативную активность, что в совокупности приводило к повреждению печени [38]. Докозагексаеновая кислота снижала выраженность алкогольного окислительного стресса в печени путем нормализации избытка мРНК глутатионредуктазы и дефицита мРНК глутатионпероксидазы [39]. Тем не менее в нескольких исследованиях продемонстрировано, что омега-3 ПНЖК (в том числе эйкозапентаеновая и докозагексаеновая кислоты) оказывают позитивное воздействие при АБП [40–42]. Так, у мышей прием рыбьего жира, особенно жира тунца (30% общей калорийности), способствовал уменьшению накопления жира в печени, вызванного однократным введением этанола, по крайней мере частично, вследствие заметного снижения уровня экспрессии стеароил-КоА-десатуразы-1 (SCD-1) в печени и активности SREBP-1 [40]. В другой работе сообщалось, что по сравнению с контрольной группой мышей, получавших только этанол, у животных, получавших высокоочищенную докозагексаеновую кислоту, значительно снизилась индуцированная этанолом активность АЛТ, уровни провоспалительных цитокинов

(интерлейкина-6 и фактор некроза опухоли α) и накопление жира в печени [42]. Это исследование также продемонстрировало, что экспрессия и активность SCD-1 в печени были значительно снижены, а экспрессия гемоксигеназы-1, фермента, повышающего резистентность гепатоцитов, была заметно увеличена у мышей, получавших докозагексаеновую кислоту, по сравнению с контрольными животными [42]. Также показано, что крысы, получавшие диету, дополненную физиологически значимыми концентрациями омега-6 ПНЖК, арахидоновой кислоты (20:4n-6) и омега-3 ПНЖК, докозагексаеновой кислоты в отношении 1 : 1, были защищены от индуцированной приемом этанола жировой дистрофии печени и митохондриальной дисфункции, скорее всего, благодаря снижению окислительного/нитрозативного стресса [41].

По данным S. Kang и соавт., омега-3 ПНЖК и соединение A (CpdA) – селективный агонист рецепторов свободных жирных кислот FFA4 – снизили вызванное этанолом увеличение накопления липидов в гепатоцитах, содержание триглицеридов и уровни АЛТ в сыворотке. Авторы заключили, что n-3 ПНЖК защищают от вызванного этанолом гепатоцеллюлярного стеатоза посредством противовоспалительного действия FFA4 на клетки Купфера [43].

Омега-6 и омега-3 ПНЖК в мембранах клеток конкурируют за перечень ферментов – элонгазы, десатуразы, липоксигеназы, циклооксигеназы, что определяет уровень их производных – простагландинов, лейкотриенов с различными эффектами. При повышенном уровне как омега-6, так и омега-3 ПНЖК у пациентов с выраженной некрвоспалительной активностью, по данным настоящей работы, содержание первых метаболитов омега-6 ПНЖК – простагландинов E_2 и D_2 , тромбксана B_2 , гидропероксизокосатетраеновых кислот, эндоканнабиоидов, липоксинов, промотирующих повреждение гепатоцитов, воспаление [22]. Вероятно, это одна из возможных причин сниженных уровней производных омега-3 ПНЖК – резольвинов E_1 , E_2 , D_{1-4} , протектина D_1 , марезина-1, обладающих протективным эффектом при АЖБП [44].

Сниженные уровни альфа-линоленовой кислоты в нашем исследовании, вероятно, обусловлены повышенной активностью десатураз, что выявлено у пациентов с алкогольной болезнью печени [45]. Избыточный расход альфа-линоленовой кислоты на синтез эйкозапентаеновой и докозагексаеновой кислот, возможно, обусловлен адаптационными механизмами в условиях систематического действия токсических доз этанола [44].

Повышенной активностью десатураз, в частности stearyl-CoA desaturase-1 (SCD1), возможно, объясняются сниженные уровни пальмитолеиновой C16:1;9, гексадекадиеновой кислот C16:2 n-6, выявленные в настоящей работе и обусловленные их участием в липогенезе *de novo* [46].

Сниженные концентрации пентадекановой кислоты C15:0 у пациентов с алкогольным стеатогепатитом не случайны. В эксперименте на мышах W. Yoo и соавт.



установили, что у животных, получавших диету с добавлением С15:0, установлено снижение уровня АСТ и более низкая инфильтрация печени макрофагами, насыщенными цероидами, по сравнению с мышами, не получавшими пентадекановую ЖК. Это позволило предположить, что дефицит С15:0 способствует повреждению печени при неалкогольном стеатогепатите [47]. Можно также предположить, что при АЖБП также реализуется протективная роль вышеописанной жирной кислоты.

Настоящее исследование имеет ряд ограничений. Изучение уровней жирных кислот в мембранах эритроцитов и сыворотке крови проведено у небольшой группы пациентов-мужчин. Разделение по степени некрвоспалительной активности в ткани печени осуществлено с помощью косвенного сывороточного теста AshTest, а не на основе данных гистологического исследования при проведении биопсии печени. У пациентов не были оценены особенности диеты, которые могли повлиять на уровни жирных кислот. Тем не менее полученные результаты следует считать перспективными для дальнейших исследований в данном направлении на больших выборках.

Заключение

Уровни арахидоновой кислоты С20:4n-6 ($p=0,000018$), суммарное содержание (С20:5n-3 + С22:6n-3) ($p=0,0027$), суммарное содержание всех омега-3 ПНЖК ($p=0,003$), уровни докозагексаеновой С22:6n-3 ($p=0,0046$), докозапентаеновой С22:5n-3 ($p=0,0054$), докозатетраеновой С22:4n-6 ($p=0,01$), эйкозапентаеновой кислоты С20:5n-3 ($p=0,048$) в мембранах эритроцитов и этой же кислоты в сыворотке крови ($p=0,0015$) оказались статистически значимо выше у пациентов с алкогольным стеатогепатитом. Напротив, концентрации альфа-линоленовой С18:3n-3 ($p=0,0032$), гексадекадиеновой С16:2 n-6 ($p=0,026$), пальмитолеиновой С16:1;9 ($p=0,033$), пентадекановой С15:0 ($p=0,04$), величины отношений НЖК/ПНЖК ($p=0,017$), НЖК/ННЖК ($p=0,029$) были ниже у пациентов с алкогольным стеатогепатитом по сравнению со стеатозом.

Использование уровней отдельных жирных кислот или их суммарного содержания в мембранах эритроцитов обеспечило достаточные уровни диагностической точности в различении степени некрвоспалительной активности у пациентов с АЖБП: арахидоновая кис-

лота С20:4n-6 – AUC 0,940; 95% ДИ 0,835–0,995, чувствительность 85,7%, специфичность 84,6%; суммарное содержание ПНЖК – AUC 0,874; 95% ДИ 0,731–0,978, чувствительность 78,6%, специфичность 84,6%; докозапентаеновая кислота С22:5n-3 – AUC 0,876; 95% ДИ 0,709–0,978, чувствительность 78,6%, специфичность 76,9%; суммарное содержание (С20:5n-3 + С22:6n-3) – AUC 0,863; 95% ДИ 0,665–0,978, чувствительность 71,5%, специфичность 84,6%. Комбинированная «панель», включающая минимальное количество жирных кислот мембран эритроцитов – С20:4n-6, С18:3n-3, НЖК/ПНЖК, обеспечила наиболее высокие уровни диагностической точности – AUC 0,954; 95% ДИ 0,8–1,0, чувствительность 92,7%, специфичность 90,3%. ●

Источник финансирования

Работа выполнена по государственному заданию в рамках бюджетной темы «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).

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Благодарности

Авторы выражают глубокую благодарность к.х.н., научному сотруднику лаборатории физиологически активных веществ ФГБУН «Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН» А.С. Соколовой за помощь в подготовке образцов для проведения исследования жирных кислот эритроцитов; к.х.н., научному сотруднику аналитической лаборатории ФГБУН «Институт катализа им. Г.К. Борескова СО РАН» М.В. Шапкову за исследование содержания жирных кислот; доценту Медицинского факультета Перельмана, Университета Пенсильвании, Филадельфия, Пенсильвания (США) к.х.н. А.А. Шестову за консультирование и помощь в статистической обработке данных.

Литература

- Jichitu A., Bungau S., Stanescu A.M.A. et al. Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular comorbidities: pathophysiological links, diagnosis, and therapeutic management. *Diagnostics (Basel)*. 2021; 11 (4): 689.
- Rinella M.E., Lazarus J.V., Ratziu V. et al. NAFLD Nomenclature consensus group. A multisociety Delphi consensus statement on new fatty liver disease nomenclature. *Hepatology*. 2023; 78 (6): 1966–1986.
- Younossi Z., Henry L. Contribution of alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease to the burden of liver-related morbidity and mortality. *Gastroenterology*. 2016; 150: 1778–85.
- EASL Clinical Practice Guidelines on non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis – 2021 update. *J. Hepatol*. 2021; 75 (3): 659–89.
- Kobyliak N., Dynnyk O., Abenavoli L. The role of liver biopsy to assess alcoholic liver disease. *Rev. Recent. Clin. Trials*. 2016; 11 (3): 175–179.



6. Cusi K., Isaacs S., Barb D. et al. American association of clinical endocrinology clinical practice guideline for the diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease in primary care and endocrinology clinical settings: co-sponsored by the american association for the study of liver diseases (AASLD). *Endocr. Pract.* 2022; 28 (5): 528–562.
7. Uslusoy H.S., Nak S.G., Gülten M., Biyikli Z. Non-alcoholic steatohepatitis with normal aminotransferase values. *World J. Gastroenterol.* 2009; 15 (15): 1863–8. DOI: 10.3748/wjg.15.1863.
8. Singal A.K., Bataller R., Ahn J. et al. ACG clinical guideline: alcoholic liver disease. *Am. J. Gastroenterol.* 2018; 113 (2): 175–194.
9. Thabut D., Naveau S., Charlotte F. et al. The diagnostic value of biomarkers (AshTest) for the prediction of alcoholic steatohepatitis in patients with chronic alcoholic liver disease. *J Hepatol.* 2006; 44 (6): 1175–1185.
10. Moreno C., Mueller S., Szabo G. Non-invasive diagnosis and biomarkers in alcohol-related liver disease. *J. Hepatol.* 2019; 70 (2): 273–283.
11. Notarnicola M., Osella A.R., Caruso M.G. et al. Nonalcoholic fatty liver disease: focus on new biomarkers and lifestyle interventions. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22 (8): 3899.
12. Tarantino G., Citro V. What are the common downstream molecular events between alcoholic and nonalcoholic fatty liver? *Lipids Health Dis.* 2024; 23 (1): 41.
13. You M., Fischer M., Deeg M.A., Crabb D.W. Ethanol induces fatty acid synthesis pathways by activation of sterol regulatory element-binding protein (SREBP). *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 29342–29347.
14. Jeon S., Carr R. Alcohol effects on hepatic lipid metabolism. *J. Lipid Res.* 2020; 61: 470–479.
15. Idalsoaga F., Kulkarni A.V., Mousa O.Y. et al. Non-alcoholic Fatty Liver Disease and Alcohol-Related Liver Disease: Two Intertwined Entities. *Front Med (Lausanne).* 2020; 7: 448.
16. You M., Matsumoto M., Pacold C.M. et al. The role of AMP-activated protein kinase in the action of ethanol in the liver. *Gastroenterology.* 2004; 127: 1798–808.
17. Bays H. Adiposopathy, "sick fat," Ockham's razor, and resolution of the obesity paradox. *Curr. Atheroscler. Rep.* 2014; 16 (5): 409.
18. Ивашкин В.Т., Маевская М.В., Жаркова М.С. 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.
19. Алкогольная болезнь печени (АБП) у взрослых. Клинические рекомендации. 2021-2022-2023 (10.01.2022) / Утв. Минздравом РФ URL: http://disuria.ru/_ld/12/1219_kr21K70MZ.pdf (дата обращения: 12.05.2024).
20. Кручинина М.В., Кручинин В.Н., Прудникова Я.И. и др. Исследование уровня жирных кислот мембран эритроцитов и сыворотки крови у пациентов с колоректальным раком г. Новосибирска. *Успехи молекулярной онкологии.* 2018; 5 (2): 50–61.
21. Breiman L. Random Forests. *Machine Learning.* 2001; 45: 5–32.
22. Kirpich I.A., Miller M.E., Cave M.C. et al. Alcoholic liver disease: update on the role of dietary fat. *Biomolecules.* 2016; 6 (1): 1.
23. Zhong W., Li Q., Xie G. et al. Dietary fat sources differentially modulate intestinal barrier and hepatic inflammation in alcohol-induced liver injury in rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2013; 305 (12): G919–32.
24. Chen P., Torralba M., Tan J. et al. Supplementation of saturated long-chain fatty acids maintains intestinal eubiosis and reduces ethanol-induced liver injury in mice. *Gastroenterology.* 2015; 148 (1): 203–214.e16.
25. Nanji A.A., Zhao S., Sadrzadeh S.M. et al. Markedly enhanced cytochrome P450 2E1 induction and lipid peroxidation is associated with severe liver injury in fish oil-ethanol-fed rats. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 1994; 18 (5): 1280–1285.
26. Nanji A.A., Jokelainen K., Tipoe G.L. et al. Dietary saturated fatty acids reverse inflammatory and fibrotic changes in rat liver despite continued ethanol administration. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2001; 299 (2): 638–644.
27. Warner J.B., Zirnheld K.H., Hu H. et al. Analysis of alcohol use, consumption of micronutrient and macronutrients, and liver health in the 2017–2018 National Health and Nutrition Examination Survey. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2022; 46 (11): 2025–2040.
28. Sadasivam N., Kim Y.J., Radhakrishnan K., Kim D.K. Oxidative stress, genomic integrity, and liver diseases. *Molecules.* 2022; 27 (10): 3159.
29. Chang H.Y., Chen J.R., Chen Y.H. et al. The preliminary results for evaluating cocoa butter's hepatoprotective effects against lipid accumulation and inflammation in adult male rats chronically fed ethanol. *Bioengineering (Basel).* 2022; 9 (10): 526.
30. Wei J., Wang S., Huang J. et al. Network medicine-based analysis of the hepatoprotective effects of *Amomum villosum* Lour. on alcoholic liver disease in rats. *Food Sci. Nutr.* 2024; 12 (5): 3759–3773.
31. Li Q., Zhong W., Qiu Y. et al. Preservation of hepatocyte nuclear factor-4 α contributes to the beneficial effect of dietary medium chain triglyceride on alcohol-induced hepatic lipid dyshomeostasis in rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2013; 37 (4): 587–598.
32. Butts M., Sundaram V.L., Murughiyan U. et al. The influence of alcohol consumption on intestinal nutrient absorption: a comprehensive review. *Nutrients.* 2023; 15 (7): 1571.
33. Yoladı F.B., Burmaoğlu E., Palabıyık Ş.S. Experimental in vivo toxicity models for alcohol toxicity. *Eurasian. J. Med.* 2023; 55 (1): 82–90.
34. Jung J.H., Kim S.E., Suk K.T., Kim D.J. Gut microbiota-modulating agents in alcoholic liver disease: Links between host metabolism and gut microbiota. *Front. Med. (Lausanne).* 2022; 9: 913842.
35. Lu Y., Cederbaum A.I. Alcohol upregulation of CYP2A5: role of reactive oxygen species. *React Oxyg Species (Apex).* 2016; 1 (2): 117–130.



36. Aliche-Djoudi F, Podechard N., Chevanne M. et al. Physical and chemical modulation of lipid rafts by a dietary n-3 polyunsaturated fatty acid increases ethanol-induced oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2011; 51: 2018–2030.
37. Aliche-Djoudi F, Podechard N., Collin A. et al. A role for lipid rafts in the protection afforded by docosahexaenoic acid against ethanol toxicity in primary rat hepatocytes. *Food Chem. Toxicol.* 2013; 60: 286–296.
38. Rolo A.P., Teodoro J.S., Palmeira C.M. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic. Biol. Med.* 2012; 52 (1): 59–69.
39. Feltham B., Louis X., Kapourchali F. et al. A supplementation during prenatal ethanol exposure alters the expression of fetal rat liver genes involved in oxidative stress regulation. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 2019; 44: 744–750.
40. Wada S., Yamazaki T., Kawano Y. et al. Fish oil fed prior to ethanol administration prevents acute ethanol-induced fatty liver in mice. *J. Hepatol.* 2008; 49 (3): 441–450.
41. Song B.J., Moon K.H., Olsson N.U., Salem N. Jr. Prevention of alcoholic fatty liver and mitochondrial dysfunction in the rat by long-chain polyunsaturated fatty acids. *J. Hepatol.* 2008; 49 (2): 262–273.
42. Huang L.L., Wan J.B., Wang B. et al. Suppression of acute ethanol-induced hepatic steatosis by docosahexaenoic acid is associated with downregulation of stearoyl-CoA desaturase 1 and inflammatory cytokines. *Prostaglandins Leukot. Essent Fatty Acids.* 2013; 88 (5): 347–353.
43. Kang S., Koh J.M., Im D.S. N-3 Polyunsaturated Fatty Acids Protect against Alcoholic Liver Steatosis by Activating FFA4 in Kupffer Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2024; 25 (10): 5476.
44. Serrano M., Rico-Barrio I., Grandes P. The effect of omega-3 fatty acids on alcohol-induced damage. *Front Nutr.* 2023; 10: 1068343.
45. Klepp T.D., Sloan M.E., Soundararajan S. et al. Elevated stearoyl-CoA desaturase 1 activity is associated with alcohol-associated liver disease. *Alcohol.* 2022; 102: 51–57.
46. Lee J.J., Lambert J.E., Hovhannisyany Y. et al. Palmitoleic acid is elevated in fatty liver disease and reflects hepatic lipogenesis. *Am. J. Clin. Nutr.* 2015; 101 (1): 34–43.
47. Yoo W., Gjuka D., Stevenson H.L. et al. Fatty acids in non-alcoholic steatohepatitis: Focus on pentadecanoic acid. *PLoS One.* 2017; 12 (12): e0189965.

Fatty Acids of Erythrocyte Membranes and Blood Serum as Biomarkers for Detection of Steatohepatitis in Patients with Alcoholic Fatty Liver Disease

M.V. Kruchinina, PhD^{1,2}, M.F. Osipenko, PhD, Prof², M.V. Parulikova¹, A.A. Gromov, PhD¹, E.V. Kruchinina²

¹ Research Institute of Internal and Preventive Medicine – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk

² Novosibirsk State Medical University

Contact person: Margarita V. Kruchinina, linkruchinina@yandex.ru

The aim of the work was to study the features of fatty acids of erythrocyte membranes and blood serum in patients with alcoholic fatty liver disease (AFLD) with different necroinflammatory activity to identify biomarkers of steatohepatitis.

Material and methods. 43 men (48.5 ± 8.1 years) with AFLD with different degrees of necroinflammatory activity according to the AshTest test were examined: Group 1 (n = 23) with minimal activity of A0–1 (steatosis), Group 2 (n = 20) – with pronounced activity of A2–3 (steatohepatitis). The study of the composition of fatty acids (FAs) of erythrocyte membranes and blood serum was carried out using gas chromatography/mass spectrometry (Agilent 7000B, USA).

Results. The levels of arachidonic acid C20:4n-6 (p = 0.000018), total content (C20:5n-3 + C22:6n-3) (p = 0.0027), total content of all omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) (p = 0.003), levels of docosahexaenoic acid C22:6n-3 (p = 0.0046), docosapentaenoic acid C22:5n-3 (p = 0.0054), docosatetraenoic acid C22:4n-6 (p = 0.01), eicosapentaenoic acid C20:5n-3 (p = 0.048) in erythrocyte membranes and the same acid in blood serum (p = 0.0015) were statistically significantly higher in patients with alcoholic steatohepatitis. In contrast, the concentrations of α-linolenic acid C18:3n-3 (p = 0.0032), hexadecadienoic acid C16:2 n-6 (p = 0.026), palmitoleic acid C16:1;9 (p = 0.033), pentadecanoic acid C15:0 (p = 0.04), the SFA/PUFA ratios (p = 0.017), SFA/UFA (p = 0.029) were lower in patients with alcoholic steatohepatitis compared to steatosis. The use of levels of individual FAs or their total content in erythrocyte membranes provided sufficient levels of diagnostic accuracy in distinguishing the degree of necroinflammatory activity in patients with AFLD: arachidonic acid – AUC 0.940, sensitivity 85.7%, specificity 84.6%; total PUFA content – AUC 0.874, sensitivity 78.6%, specificity 84.6%; docosapentaenoic acid – AUC 0.876, sensitivity 78.6%, specificity 76.9%; sum content (C20:5n-3 + C22:6n-3) – AUC 0.863, sensitivity 71.5%, specificity 84.6%. The combined 'panel', including a minimum amount of FAs of erythrocyte membranes – C20:4n-6, C18:3n-3, SFA/PUFA, provided the highest levels of diagnostic accuracy – AUC 0.954; 95% CI 0.8–1.0, sensitivity 92.7%, specificity 90.3%.

Conclusion. FAs of erythrocyte membranes, blood serum should be considered as promising pathogenetically substantiated biomarkers for identifying patients with steatohepatitis in AFLD.

Keywords: alcoholic fatty liver disease, steatohepatitis, diagnostics, fatty acids, erythrocyte membranes, blood serum