

# ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ORIGINAL RESEARCHES

<https://doi.org/10.17816/mechnikov20181045-14>

## ОЦЕНКА МЕТАБОЛОМА СЫВОРОТКИ КРОВИ — ПЕРСПЕКТИВНЫЙ МЕТОД ДИАГНОСТИКИ НЕАЛКОГОЛЬНОЙ ЖИРОВОЙ БОЛЕЗНИ ПЕЧЕНИ У МУЖЧИН

М.П. Абациева<sup>1</sup>, И.Г. Бакулин<sup>1</sup>, С.И. Ситкин<sup>1</sup>, Т.Я. Вахитов<sup>2</sup>, Е.В. Демьянова<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург;

<sup>2</sup> ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург

Для цитирования: Абациева М.П., Бакулин И.Г., Ситкин С.И., и др. Оценка метаболома сыворотки крови — перспективный метод диагностики неалкогольной жировой болезни печени у мужчин // Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова. – 2018. – Т. 10. – № 4. – С. 5–14. <https://doi.org/10.17816/mechnikov20181045-14>

Поступила: 11.10.2018

Одобрена: 19.11.2018

Принята: 07.12.2018

♦ Диагностика заболеваний печени, в частности неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП), во многом определяется информативными, безопасными, неинвазивными, высокочувствительными методами, которые могут быть применены у всех пациентов без исключения. Одним из таких методов является газовая хромато-масс-спектрометрия (ГХ-МС). В процессе исследования мы оценивали метаболом сыворотки крови с помощью метода ГХ-МС у лиц мужского пола для диагностики НАЖБП на стадии неалкогольного стеатогепатита. В образцах сыворотки крови, полученных от 25 пациентов, было идентифицировано 319 соединений, из которых аннотировали 109. У пациентов с НАЖБП отмечалось достоверное повышение индолкарбоновых и жирных кислот, гипоксантина, гидроксикарбоновых и фенолкарбоновых кислот. Результаты исследования показали, что пониженный уровень 4-гидроксимасляной кислоты и соединения-360 говорит о возможном их влиянии на патогенез НАЖБП, а повышенный уровень сахарного спирта — о возможном повреждающем действии на клетки печени. Для выявленных соединений — 4-гидроксимасляной кислоты, соединения-360 и сахарного спирта — были продемонстрированы высокие значения специфичности и чувствительности, высокий доверительный интервал и значения AUC, что говорит о возможности использования масс-спектрометрического анализа метаболома плазмы крови для диагностики НАЖБП на стадии стеатогепатита с высокой степенью надежности и вероятности.

♦ **Ключевые слова:** неалкогольная жировая болезнь печени; стеатогепатит; биомаркеры; метаболомика; 4-гидроксимасляная кислота; газовая хромато-масс-спектрометрия.

## BLOOD SERUM METABOLOMIC ASSESSMENT — A PERSPECTIVE DIAGNOSTIC METHOD FOR NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE IN MEN

M.P. Abatsieva<sup>1</sup>, I.G. Bakulin<sup>1</sup>, S.I. Sitkin<sup>1</sup>, T.Ya. Vakhitov<sup>2</sup>, E.V. Demyanova<sup>2</sup>

<sup>1</sup> North-Western State Medical University named I.I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia;

<sup>2</sup> State Research Institute of Highly Pure Biopreparations FMBA of Russia, Saint Petersburg, Russia

For citation: Abatsieva MP, Bakulin IG, Sitkin SI, et al. Blood serum metabolomic assessment — a perspective diagnostic method for non-alcoholic fatty liver disease in men. *Herald of North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov*. 2018;10(4):5-14. <https://doi.org/10.17816/mechnikov20181045-14>

Received: October 11, 2018

Revised: November 19, 2018

Accepted: December 7, 2018

♦ Diagnosis of liver disease in particular non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is largely determined by methods that are informative, safe, non-invasive, highly sensitive and can be used in all patients without exception. One of these methods is gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Our study presents the results of serum

metabolome assessment by the GC-MS method in male patients for the diagnosis of NAFLD at the stage of non-alcoholic steatohepatitis. In serum samples obtained from 25 patients, 319 compounds were identified, among them 109 were annotated. In patients with NAFLD, there was a significant increase in indole carboxylic and fatty acids, hypoxanthine, hydroxycarboxylic and phenylcarboxylic acids. The results of the study showed that low-molecular metabolites in particular reduced levels of 4-hydroxybutyric acid and 360 compounds suggests possible influence of metabolites on the pathogenesis of NAFLD, and an elevated level of sugar alcohol suggests a possible damaging effect on liver cells. For the detected compounds 4-hydroxybutyric acid, compound-360 and sugar alcohol, high specificity and sensitivity values, high confidence intervals and AUC values were shown, which indicates the possibility of using mass spectrometry analysis of plasma metabolome at high levels of steatohepatitis with high degree of reliability and probability.

♦ **Keywords:** nonalcoholic fatty liver disease; steatohepatitis; biomarkers; metabolomics; 4-hydroxybutyric acid; gas chromatography-mass spectrometry.

## Введение

По данным Всемирной организации здравоохранения, в последние годы регистрируется неуклонный рост числа хронических заболеваний печени, в частности неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП). Распространенность НАЖБП в мире варьирует от 6,3 до 33 %. Результаты открытого многоцентрового рандомизированного проспективного исследования (наблюдение DIREG\_L\_01903 с участием 30 787 пациентов) показывают, что распространенность НАЖБП в России составляет 27 %, при этом у 80,3 % пациентов был диагностирован стеатоз, у 16,8 % — стеатогепатит, у 2,9 % — цирроз печени [1, 2].

Прогрессирование НАЖБП до 2030 г. было оценено по шкале METAVIR. Моделирование проводили путем умножения общего числа случаев на конкретной стадии заболевания на скорость прогрессирования до следующей стадии, исследование отслеживали по возрасту и полу. Важным этапом в разработке модели Марка было сопоставление результатов с данными национального регистра о заболеваемости и смертности от рака. Исходя из модели Марка, распространенность случаев НАЖБП увеличится на 21 % (с 83,1 млн в 2015 г. до 100,9 млн в 2030 г.), в то время как распространенность случаев неалкогольного стеатогепатита (НАСГ) — на 63 % (с 16,52 до 27,00 млн случаев), что отражает прогрессирование заболевания, увеличение доли пациентов с СД 2-го типа и возрастного контингента. Ожидается, что распространенность НАЖБП увеличится за счет декомпенсированного цирроза печени на 168 % (с 39 320 случаев в 2015 г. до 105 430 случаев в 2030 г.); количество трансплантаций печени увеличится на 59 % (с 4780 до 7610 в течение 2015–2030 гг.); распространенность гепатоцеллюлярной карциномы — на 146 % (с 10 100 до 24 900 в течение 2015–2030 гг.) [3].

Гендерные различия НАЖБП до конца не изучены, однако есть данные, указывающие на то, что к заболеванию наиболее предрасположены мужчины, такая же закономерность прослеживается и среди детей [4].

В исследовании А.А. Шиповской и др. (2016) выявлено, что в структуре НАЖБП у мужчин признаки НАСГ и стеатоза возникали в среднем на 7 лет раньше, чем у женщин. Также у пациентов мужского пола отмечались более выраженные маркеры печеночноклеточного воспаления, дислипидемии и фиброза по сравнению с женщинами. Данные факты свидетельствуют о более агрессивном течении НАЖБП у мужчин в сравнении с женщинами [5].

НАЖБП прогрессирует от накопления триглицеридов до накопления жира с воспалением и клеточным повреждением — НАСГ, который в конечном счете может прогрессировать до фиброза, цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы [6].

Склонность прогрессирования НАЖБП в эпидемиологической структуре хронических заболеваний печени определяет актуальность изучаемого вопроса. Кроме того, не решен вопрос дифференциально-диагностических и потенциальных биомаркеров. НАЖБП, как правило, характеризуется бессимптомным и медленным течением, и наиболее часто заболевание выявляется случайно.

Для постановки диагноза НАЖБП наряду со сбором анамнеза необходимо ориентироваться как на результаты анализов крови, так и на данные инструментальных исследований. Пошаговый алгоритм позволяет исключить другие заболевания печени и установить верный диагноз.

В последние несколько лет в медицине намечился существенный прогресс в области разработки неинвазивных биологических маркеров, дающих возможность оценивать тяжесть

некровоспалительных процессов и фиброза печени у пациентов с НАЖБП. В настоящее время все биомаркеры можно подразделить по способу регистрации и патофизиологии на несколько групп: биомаркеры, регистрируемые с использованием «омикс»-технологии, — гликомики, протеомики и/или метаболомики; биомаркеры, регистрируемые с помощью методов визуализации, таких как магнитный резонанс и эластография; а также маркеры, участвующие в патогенезе [7].

В нашем исследовании для диагностики НАЖБП мы использовали «омикс»-технологии, а именно метаболомику. Метаболомика — это исследование полного набора низкомолекулярных соединений в биологических образцах (сыворотка крови, биоптаты, моча, фекалии). Метаболомика, представляя молекулярный фенотип человека, наиболее перспективна в плане клинического применения среди «-омных» наук. Для проведения метаболомных исследований чаще всего используют магнитно-резонансную спектроскопию и масс-спектрометрию.

Газовая хромато-масс-спектрометрия (ГХ-МС) сыворотки крови позволяет оценить совокупный метаболизм организма, который может быть нарушен при НАЖБП. Жирные кислоты, как новые биомаркеры НАЖБП и НАСГ, могут быть использованы в качестве дифференциально-диагностических маркеров и предикторов прогрессирующего течения НАЖБП в целом. Применение ГХ-МС сокращает время анализа, повышает его точность и надежность на разных стадиях НАЖБП, в частности в опре-

делении жирных кислот сыворотки крови [8]. Существуют исследования по выявлению биомаркеров раннего развития и прогнозирования течения НАЖБП [9–12].

**Целью** настоящего исследования было определение состава низкомолекулярных метаболитов сыворотки крови с помощью ГХ-МС у мужчин с неалкогольной жировой болезнью печени для оценки их диагностической значимости и возможности применения указанного метода у данной категории пациентов.

### Материалы и методы

В исследовании принимали участие 25 пациентов мужского пола, 20 человек — пациенты со стеатозом и НАСГ. Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на научное использование полученных образцов и на участие в исследовании. Группу контроля составили 5 человек — практически здоровые лица (добровольцы) мужского пола в возрасте  $48,6 \pm 5,6$  года.

Диагноз НАЖБП устанавливали на основании данных анамнеза, лабораторных и инструментальных методов исследования, с помощью неинвазивных методов (FibroMax, фибротесты), а также гистоморфологического исследования печени после пункционной гепатобиопсии (табл. 1). У всех пациентов исключали хронические вирусные гепатиты, аутоиммунные заболевания печени, алкогольную болезнь печени, лекарственно индуцированные и генетические заболевания печени.

Таблица 1 / Table 1

Клинико-лабораторные показатели при разных формах неалкогольной жировой болезни печени у мужчин  
Clinical and laboratory indicators in various forms of NAFLD in men

Показатель	Здоровые	Стеатоз	Неалкогольный стеатогепатит
Возраст, лет	$48,6 \pm 5,6$	$47,3 \pm 5,4$	$48,4 \pm 6,1$
Пол (мужской)	5	10	10
APRI* < 0,5 — нет фиброза, > 1,0 — фиброз	$0,24 \pm 0,05$	$0,26 \pm 0,06$	$1,15 \pm 0,14^{**}$
FIB 4* < 1,45 — нет фиброза, > 3,25 — фиброз	$0,82 \pm 0,17$	$0,81 \pm 0,11$	$3,02 \pm 0,59^*$
NAFLD score	$-2,5605 \pm 0,2899$	$-1,7826 \pm 0,3658^{**}$	$-0,5372 \pm 0,4577$
АСТ	$22,1 \pm 8,51$	$34 \pm 11,21^*$	$64,32 \pm 31,16$
АЛТ	$16,8 \pm 7,55$	$60,13 \pm 38,84$	$104,44 \pm 61,71^{**}$

Примечание. \*APRI, \*FIB4 — неинвазивные методы определения значимого фиброза и цирроза; \* различия достоверны в группе больных стеатоза; \*\* различия достоверны в группе больных неалкогольным стеатогепатитом.

Забор венозной крови, получение и хранение сыворотки для целей исследований проводили в соответствии с действующими стандартами: ГОСТ Р 53079.4-2008 «Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа» (введен с 01.01.2010); ГОСТ Р ИСО 6710-2009 (введен с 01.03.2010; аналог международного стандарта ISO 6710, определяющий требования к контейнерам и пробиркам для сбора венозной крови) и другими нормативными документами.

Забор крови у пациентов производили утром натощак с помощью вакуумных систем для взятия венозной крови RusTech. После забора образцы крови для получения сыворотки сразу же центрифугировали в течение 15 мин при скорости вращения 3000 оборотов. Далее полученную сыворотку с помощью одноразовых пластмассовых пипеток (емкостью до 3 мл) распределяли в две стерильные пробирки с герметично закручивающимися крышками (не менее 0,5 мл сыворотки в каждую пробирку). Пробирки маркировали с указанием фамилии, инициалов, идентификационного номера пациента, номера пробы (образца) и номера пробирки (1 или 2).

После маркировки пробирки помещали в специальный биомедицинский морозильник, предназначенный для хранения компонентов крови и вакцин, диагностических образцов и проб при температуре от  $-20$  до  $-35$  °С. В рамках исследования организовали хранение сывороток крови всех принимавших участие в исследовании здоровых добровольцев и больных (создали банк сывороток крови). При этом сыворотку крови из одной пробирки (две пробирки на каждого пациента) использовали для определения метаболомного профиля крови методом ГХ-МС, а из второй пробирки — для формирования банка.

Для проведения анализа методом ГХ-МС образцы сывороток крови размораживали при комнатной температуре. Отбирали по 0,1 мл, добавляли 0,5 мл ацетонитрила, перемешивали в течение трех минут на вортексе медицинском вибрационном (V-3 ELMi), прозрачную надосадочную жидкость отбирали, а осадок еще раз промывали 0,5 мл ацетонитрила. Оба раствора объединяли, переносили в виалу и сушили в токе азота с использованием микрокомпрессора до получения сухого остатка (20–30 мин). К сухому остатку в качестве внутреннего стандарта добавляли 10 мкл растворенного в ме-

таноле эфира тридегтерометанола и тридекановой кислоты (MW 231, C = 2 мг/мл, или 8,7 мМ), вновь высушивали, добавляли 100 мкл силицирующего агента N,O-бис (триметилсилил) трифторацетамида (BSTFA, N,O-bis (trimethylsilyl)-trifluoroacetamid) и выдерживали 3 минуты при 50 °С для получения летучих производных — силоксанов.

Газохроматографические исследования осуществляли с помощью хромато-масс-спектрометра GCMS-QP2010 Plus (Shimadzu, Япония) с программным обеспечением GCMS solution для обработки данных и базой масс-спектральной информации NIST08 (National Institute of Standards and Technology, США). Хроматографическое разделение проводили на аналитической капиллярной колонке Agilent HP Ultra-2 (5 % (фенил)метилполисилоксан) длиной 25 м, внутренним диаметром 0,2 мм и толщиной пленки неподвижной фазы 0,25 мкм.

Для хроматографирования использовали программируемый нагрев колонки от 50 до 290 °С со скоростью 10 °С/мин, время анализа составляло 40 мин, время при начальной температуре колонки (50 °С) — 3 минуты, при конечной (290 °С) — 13 минут. Объем вводимой пробы — 100 мкл, деление потока 1 : 50, поток газа-носителя (гелий) через колонку — 1 мл/мин, температура инжектора и детектора — 280 °С.

Хроматограмму образца регистрировали в двух режимах:

- 1) с 1 до 6,4 мин — мониторинг ионов  $m/z = 103, 117, 145$  (режим SIM);
- 2) с 6,4 до 40 мин — мониторинг по полному ионному току в диапазоне масс от 35 до 550 (режим SCAN).

Выбор первого режима был обусловлен необходимостью зафиксировать пики муравьиной, уксусной и масляной кислот на фоне силилирующего агента (BSTFA), содержащегося в большом избытке.

Хроматограмму регистрировали в режиме записи полного ионного тока с частотой 2,5 скана в секунду.

Полученные в результате ГХ-МС хроматограммы обрабатывали с помощью MetAlign, AOutput, в результате получали матрицу данных. Затем данные загружали в пакет программ BioClassifier.py и обрабатывали с помощью метода главных компонент (PCA), а также классификаторов — SVM (Support Vector Machine), PLS-DA (Partial Least Squares Discriminant Analysis), Naive Bayes. Классификаторы SVM и PLS-DA строят раз-

деляющую гиперплоскость в N-мерном пространстве концентраций веществ. Программы выполняют серию случайных экспериментов, которые заключаются в случайном разделении образцов каждого класса на тренировочные и тестовые, последующем построении классификатора каждым из методов по тренировочным и проверке его работы по тестовым образцам. В итоге строится ROC-кривая для каждого из методов, а также выводятся средняя точность и ее дисперсия.

### Результаты и их обсуждение

В ходе исследования метаболома сыворотки крови здоровых добровольцев и пациентов с НАСГ методом ГХ-МС было идентифицировано 319 соединений, из них с помощью баз данных NIST (National Institute of Standards and Technology); HMDB (Human Metabolome Database), MassBank (база данных с масс-спектрометрическими данными для органических соединений) и GOLM (Golm Metabolome Database) аннотировали 109 соединений.

Среди низкомолекулярных соединений как у больных с НАСГ, так и у здоровых лиц были выявлены индолкарбоновые и жирные кислоты, гипоксантин, гидроксикарбоновые и фенилкарбоновые кислоты.

**Индолкарбоновые кислоты.** Предшественником индолкарбоновых кислот является триптофан — протеиногенная аминокислота, которая входит в состав белков всех известных живых организмов. Триптофан — это биологический прекурсор серотонина и ниацина. Также триптофан является биохимическим предшественником индольных алкалоидов [13]. В нашем исследовании был обнаружен метаболит триптофана — индолуксусная кислота (ИУК). ИУК представляет собой продукт метаболизма триптофана и часто продуцируется микроорганизмами, населяющими кишечник. ИУК часто встречается в высоких концентрациях в моче пациентов с фенилкетонурией. Известно, что индолуксусная кислота также является растительным гормоном, членом группы фитогормонов, называемых ауксинами [14].

**Жирные кислоты.** Изовалериановая кислота относится к кислотам с разветвленной углеводной цепью и к короткоцепочечным жирным кислотам (КЦЖК), которые играют важную роль в патогенезе НАЖБП. Изовалериановая кислота, в частности, является продуктом жизнедеятельности нормальной микрофлоры кишечника. Существуют данные об участии

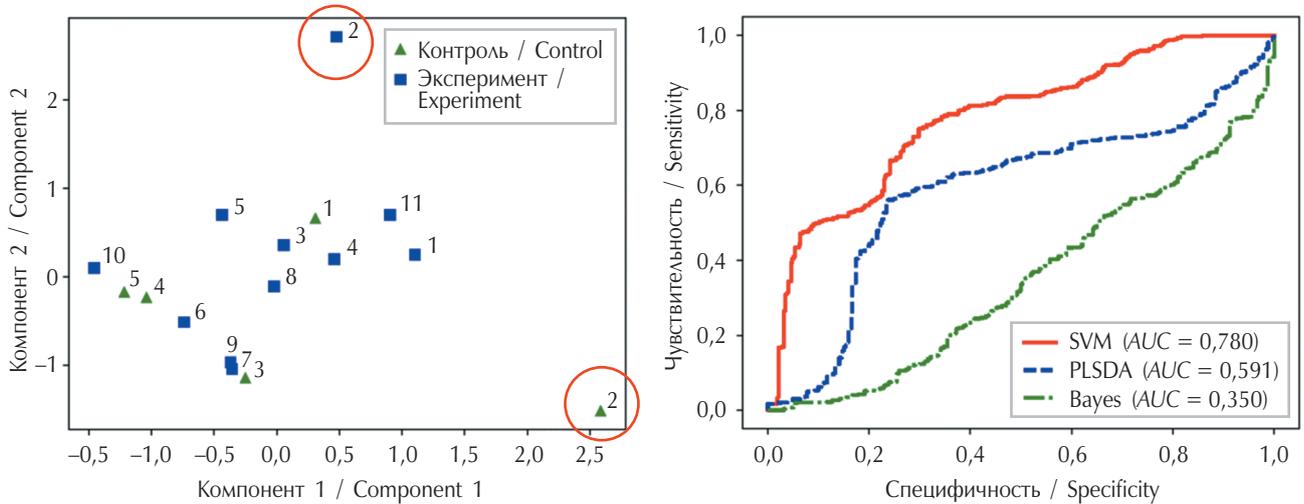
жирных кислот в патогенезе НАЖБП [15]. Капроновая кислота представляет собой монокарбоновую кислоту с длиной цепи до 8 атомов углерода. В присутствии капроновой кислоты тормозится развитие условно-патогенных штаммов, которые в большинстве своем характеризуются протеолитическим типом метаболизма. В ряде исследований обнаружены изменения метаболитов кишечной микрофлоры, снижение суммарного количества КЦЖК у больных с НАЖБП, повышение оксида азота, эндотоксина, что может служить наиболее достоверными показателями, характеризующими степень дисбиоза толстой кишки [16, 17].

**Гипоксантин** представляет собой природное производное пурина и промежуточное звено реакции метаболизма аденозина. В исследовании Wu et al. (2009) выявлено снижение концентрации гипоксантина в моче у пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой по сравнению с контрольной группой [18].

**4-Гидроксимасляная кислота (4-ГМК)**, также известная как гамма-гидроксипутират, является предшественником и метаболитом гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК). ГМК действует как нейромодулятор центральной нервной системы. В исследовании T. Shinka et al. (2002) с помощью ГХ-МС было обнаружено, что недостаточность 4-ГМК в моче и ее родственных соединений приводит к дефициту янтарной полуальдегиддегидрогеназы [19].

**Гидроксифенилмолочная кислота**, или 4-гидроксифениллактат (L-форма), представляет собой метаболит тирозина. Уровень L-гидроксифенилмолочной кислоты повышен у пациентов с дефицитом фермента п-гидроксифенилпируватоксидазы. L-гидроксифениллактат присутствует в относительно более высоких концентрациях в спинномозговой жидкости и моче пациентов с фенилкетонурией и тирозинемией. Однако D-форма гидроксифениллактата имеет бактериальное происхождение и также встречается у людей с избыточным бактериальным ростом или измененной кишечной микрофлорой. Бифидобактерии и лактобациллы вырабатывают значительное количество фениллактата и п-гидроксифениллактата. Было также показано, что гидроксифениллактат снижает продукцию реакционноспособных видов кислорода как в митохондриях, так и в нейтрофилах, и поэтому гидроксифениллактат может функционировать как естественный антиоксидант [20].

С помощью метода главных компонент (PCA — Principal Component Analysis) все



**Рис. 1.** Распределение образцов сыворотки крови контрольной группы и пациентов с неалкогольным стеатогепатитом по области компонент; ROC-кривые оценки чувствительности и специфичности для каждого классификатора: SVM ( $AUC = 0,780$ ), PLSDA ( $AUC = 0,591$ ), Bayes ( $AUC = 0,350$ ). ▲ контроль — здоровые, ■ эксперимент — пациенты с неалкогольным стеатогепатитом

**Fig. 1.** Distribution of the control group and patients with steatohepatitis by component area; ROC-sensitivity-specificity estimation curves for each classifier: SVM ( $AUC = 0.780$ ), PLSDA ( $AUC = 0.591$ ), Bayes ( $AUC = 0.350$ ). ▲ control — healthy, ■ experiment — patients with NASH

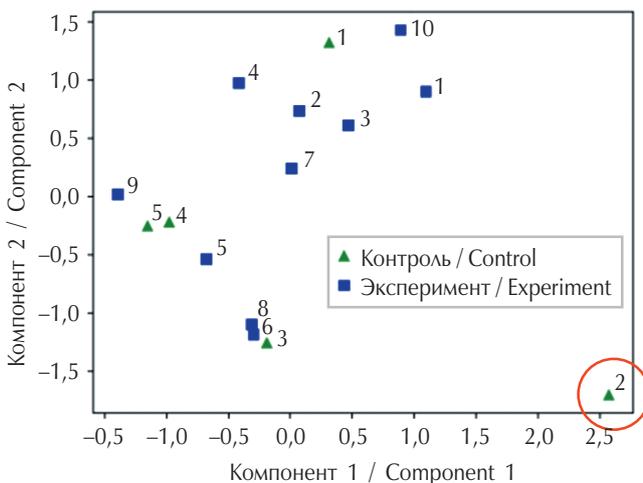
образцы распределялись на плоскости с координатами компонент 1 и компонент 2. Применение данного метода позволило оценить наличие выбросов в массиве. Из рис. 1 видно, что образец № 2 из контрольной группы (здоровые) и образец № 2 из группы эксперимента (пациенты с НАСГ) расположены на удалении от остальных образцов. В связи с этим можно

предположить, что эти образцы являются выбросами (рис. 1).

В результате образец № 2 из группы эксперимента (НАСГ) был исключен из массива данных, и затем вновь проведена обработка с помощью BioClassifier.py. Из рис. 2 видно, что образец № 2 из группы контроля по-прежнему выделяется из группы других образцов.

Удаление образца № 2 контрольной группы и повторная обработка данных с использованием BioClassifier.py привели к тому, что все оставшиеся образцы равномерно распределились по плоскости компонент 1 — компонент 2 (рис. 3).

На рис. 3 приведены ROC-кривые оценки чувствительности и специфичности для каждого классификатора. Видно, что значения площадей под кривыми для всех классификаторов удовлетворительного качества, но для классификатора SVM значение  $AUC$  было наибольшим ( $AUC = 0,609$ ). Классификаторы в программе BioClassifier.py выводят списки всех соединений по убыванию значимости в разделении групп контроля и эксперимента. В этой связи с помощью классификатора SVM были выбраны первые 60 соединений, разделяющих группы здоровых лиц и пациентов с НАСГ. Из них концентрации четырех соединений достоверно различались у больных пациентов и здоровых по критерию Манна – Уитни (табл. 2). Не все достоверно различающиеся соединения были



**Рис. 2.** Распределение контрольной группы и пациентов с неалкогольным стеатогепатитом по области компонент после удаления образца из группы с НАСГ

**Figure 2.** Distribution of the control group and patients with NASH in the component area after removal of the sample from the group with NASH

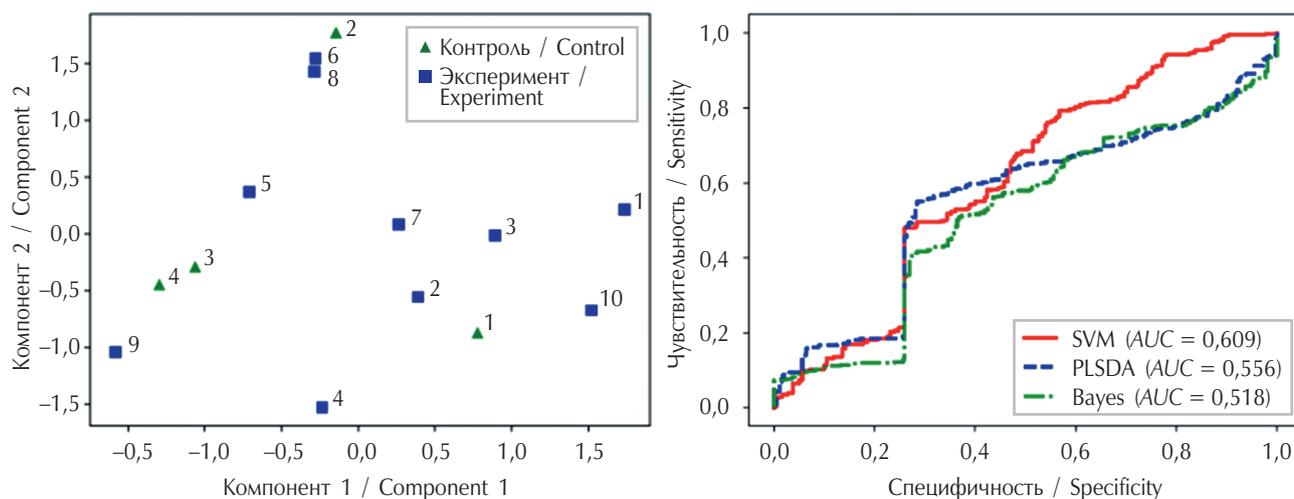


Рис. 3. Распределение контрольной группы и пациентов с неалкогольным стеатогепатитом по области компонент после удаления образца из группы с НАСГ и образца из группы здоровых; ROC-кривые оценки чувствительности и специфичности для каждого классификатора: SVM ( $AUC = 0,609$ ), PLSDA ( $AUC = 0,556$ ), Bayes ( $AUC = 0,518$ )

Fig. 3. Distribution of the control group and patients with NASH by component area; ROC-sensitivity-specificity estimation curves for each classifier: SVM ( $AUC = 0.609$ ), PLSDA ( $AUC = 0.556$ ), Bayes ( $AUC = 0.518$ )

Таблица 2 / Table 2

Критерий Манна – Уитни и межквартильные интервалы выявленных соединений  
Mann-Whitney test and interquartile intervals of the identified compounds

Показатель	Здоровые ( $n = 4$ ) Me (IQR)	Больные ( $n = 10$ ) Me (IQR)	При $p$ -value < 0,05 различия считали достоверными Тест Манна – Уитни
Сахарный спирт	177 (150–291)	2880 (774–6334)	0,02398
4-Гидроксимасляная кислота	4176 (2179–5021)	506 (347–1896)	0,02
Соединение-360	167616 (45378–375121)	2222 (1096–14414)	0,007992

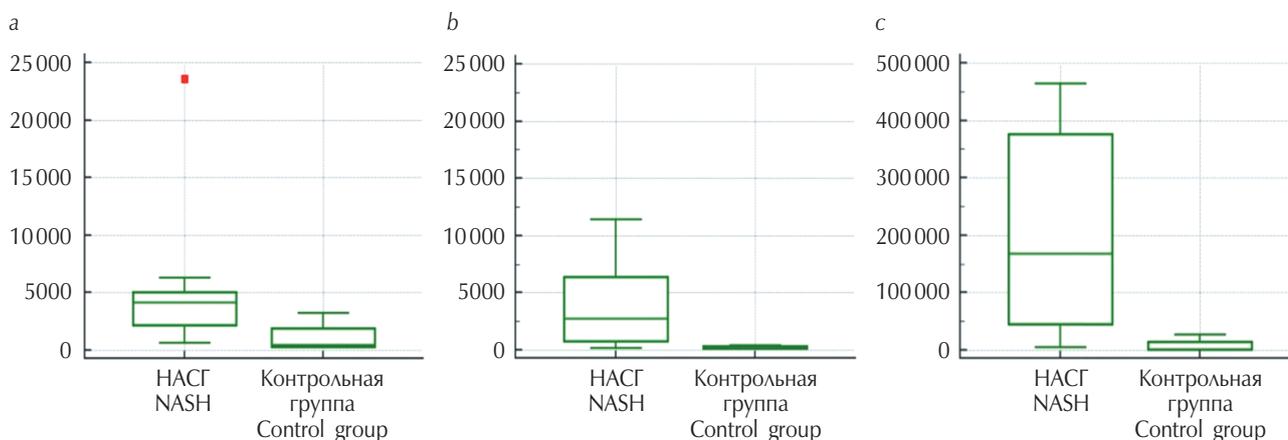


Рис. 4. Box-plot для 4-гидроксимасляной кислоты (a), сахарного спирта (b) и соединения-360 (c)

Fig. 4. Box-plot for 4-hydroxybutyric acid (a), sugar alcohol (b) and 360 compounds (c)

Таблица 3 / Table 3

Значения AUC и доверительный интервал для выявленных соединений  
AUC values and confidence intervals for detected compounds

Маркер	AUC	SE AUC	SE стандартное отклонение	95 % доверительный интервал
4-Гидроксимасляная кислота	0,9	0,08537	0,108	0,624–0,994
Соединение-360	0,95	0,05858	0,06	0,691–1,00
Сахарный спирт	0,925	0,07296	0,0925	0,657–0,998

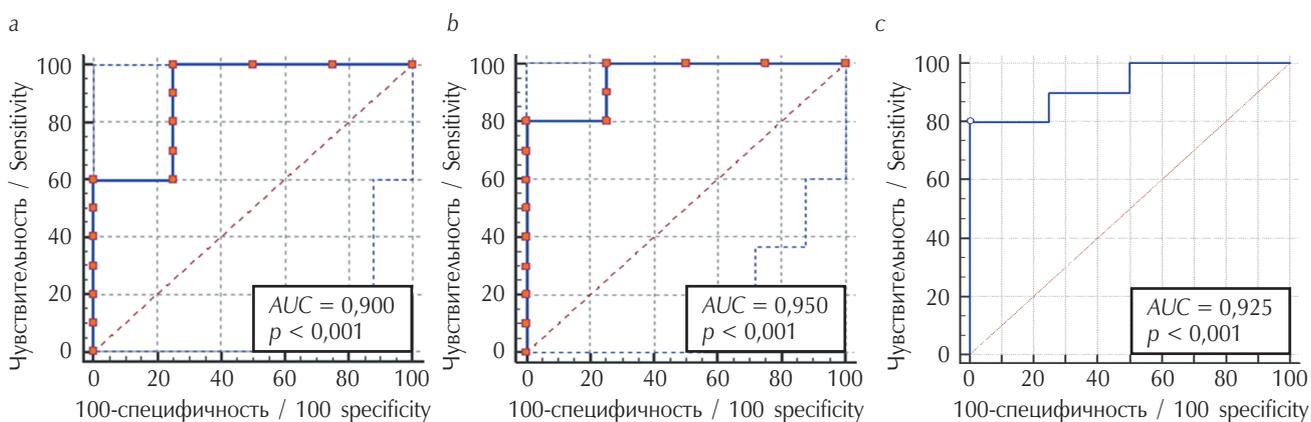


Рис. 5. ROC-кривые 4-гидроксимасляной кислоты (a), сахарного спирта (b) и соединения-360 (c)

Fig. 5. ROC-curves of 4-hydroxybutyric acid (a), 360 compounds (b) and sugar alcohol (c)

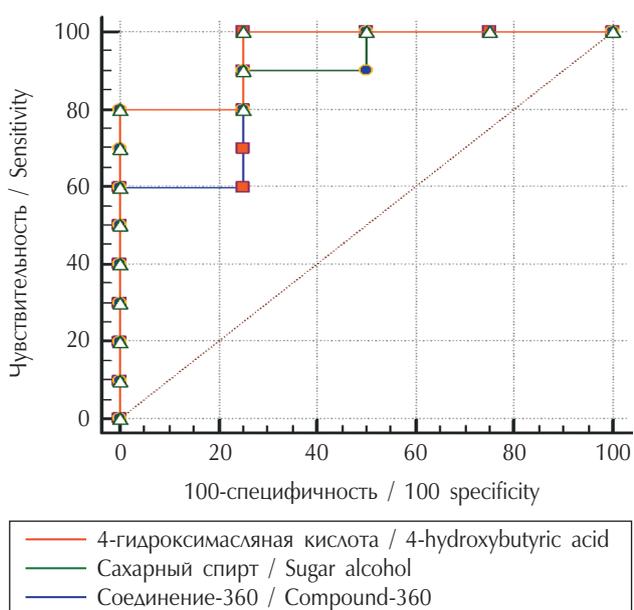


Рис. 6. Сравнение ROC-кривых 4-гидроксимасляной кислоты, сахарного спирта и соединения-360

Fig. 6. Comparison of ROC-curves of 4-hydroxybutyric acid, sugar alcohol and compound-360

аннотированы, для таких соединений был использован порядковый номер, например соединение-360, или групповое название — сахарный спирт. Одно соединение было исключено из группы (соединение-459), поскольку было установлено, что оно не являлось компонентом сыворотки крови.

Для визуализации различий в концентрациях этих соединений были построены графики Vox-plots (рис. 4).

Для оценки диагностической ценности выявленных соединений были построены ROC-кривые, рассчитаны значения AUC и *t* (табл. 3).

При проведении ROC-анализа пороговое значение для 4-гидроксимасляной кислоты составило 554 (AUC = 0,900; 95 % ДИ (0,624–0,994)) с 100 % чувствительностью и 75 % специфичностью (см. рис. 3); для соединения-360 оказалось > 26 425 (AUC = 0,950; 95 % ДИ (0,691–1,00)) с 80 % чувствительностью и 100 % специфичностью; для сахарного спирта было > 379 (AUC = 0,925; 95 % ДИ (0,657–0,998)) с 80 % чувствительностью и 100 % специфичностью. Данные результаты позволяют предположить, что выявленные

соединения с высокой степенью надежности могут служить в качестве диагностических маркеров. Высокие значения *AUC* также указывают на пригодность масс-спектрометрического анализа метаболома плазмы крови для диагностики НАЖБП.

При сравнении ROC-кривых перечисленных соединений не было обнаружено различий между 4-гидроксимасляной кислотой и соединением-360 ( $p = 0,74$ ); 4-гидроксимасляной кислотой и сахарным спиртом ( $p = 0,71$ ) и соединением-360 и сахарным спиртом ( $p = 0,71$ ) (рис. 6). Это означает, что данные соединения можно использовать для диагностики НАЖБП в стадии НАСГ как отдельно, так и в группе соединений-маркеров.

### Заключение

НАЖБП представляет собой социально значимое заболевание. Проблема профилактики и/или лечения данного заболевания исходит из отсутствия эффективной лабораторной диагностики, поэтому применение современных «омикс»-технологий, в том числе метаболомики, с целью улучшения лабораторной неинвазивной диагностики является актуальным.

Метаболомика — это перспективный метод, который может быть использован для определения метаболомного фингерпринта различных заболеваний, прогрессирования и ранней диагностики заболеваний.

В нашем исследовании предпринята попытка исследовать метаболом сыворотки крови с помощью метода ГХ-МС у лиц мужского пола для диагностики НАЖБП на стадии НАСГ. Результаты продемонстрировали, что выявленные низкомолекулярные метаболиты сыворотки крови могут считаться перспективными диагностическими маркерами НАЖБП на стадии НАСГ. Для трех соединений — 4-гидроксимасляной кислоты, соединения-360 и сахарного спирта — были показаны высокие значения специфичности и чувствительности, доверительного интервала и значения *AUC*, что может говорить о возможности использования масс-спектрометрического анализа метаболома плазмы крови для диагностики с высокой степенью надежности и вероятности.

Данное исследование включало небольшую выборку пациентов. В перспективе планируется расширение когорты пациентов, определение маркеров прогрессирования НАЖБП (стеатоз и НАСГ), сравнительное исследование с включением женщин.

### Список литературы

1. Бакулин И.Г., Сандлер Ю.Г., Кейян В.А., и др. Оценка стеатоза печени с помощью неинвазивного метода: миф или реальность? // Доктор.Ру. Гастроэнтерология. – 2015. – № 12(113). – С. 57–64. [Bakulin IG, Sandler YuG, Keiyan VA., et al. Noninvasive Assessment of Hepatic Steatosis: Myth or Reality? *Doctor.Ru. Gastroenterology*. 2015;(12(113)):57-64. (In Russ.)]
2. Бакулин И.Г., Абациева М.П. Неинвазивные методы в диагностике неалкогольной жировой болезни печени // Медико-социальная экспертиза и реабилитация. – 2017. – Т. 20. – № 2. – С. 107–112. [Bakulin IG, Abatsieva MP. Noninvasive methods in the diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease. *Medical-social examination and rehabilitation*. 2017;20(2):107-112. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.18821/1560-9537-2017-20-2-107-112>.
3. Estes C, Razavi H, Loomba R, et al. Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2018;67(1):123-133. <https://doi.org/10.1002/hep.29466>.
4. Doulberis M, Kotronis G, Gialamprinou D, et al. Non-alcoholic fatty liver disease: an update with special focus on the role of gut microbiota. *Metabolism*. 2017;71:182-197. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2017.03.013>.
5. Шиповская А.А., Ларина Н.А., Дуданова О.П. Клинические особенности неалкогольной жировой болезни печени в гендерном аспекте // Journal of biomedical technologies. – 2016. – № 1. – С. 35–40. [Shipovskaya AA, Larina NA, Dudanova OP. Clinical features of nonalcoholic fatty liver disease: gender aspect. *Journal of biomedical technologies*. 2016;(1):35-40. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.15393/j6.art.2016.3522>.
6. Molnar MZ, Joglekar K, Jiang Y, et al. Association of Pre-Transplant Renal Function with Liver Graft and Patient Survival after Liver Transplantation in Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis. *Global NAFLD Consortium. Liver Transpl*. 2018 Oct 28. <https://doi.org/10.1002/lt.25367>.
7. Neuman MG, Cohen LB, Nanau RM. Biomarkers in non-alcoholic fatty liver disease. *Can J Gastroenterol Hepatol*. 2014;28(11):607-618. <https://doi.org/10.1155/2014/757929>.
8. Ситкин С.И., Калинина Е.А., Волкунович Т.А., и др. Метаболомика — новый подход к диагностике заболеваний на молекулярном уровне // Лечение и профилактика. – 2013. – № 2 (6). – С. 117–124. [Sitkin SI, Kalinina YeA, Volkunovich TA, et al. The metabolomics as a new approach to diagnostic of diseases on the molecular level. *Disease treatment and prevention*. 2013;(2(6)):117-124. (In Russ.)]
9. Loomba R, Quehenberger O, Amado A, et al. Polyunsaturated fatty acid metabolites as novel lipidomic biomarkers for noninvasive diagnosis of nonalcoholic steatohepatitis. *Journal of Lipid Research*. 2015 Jan;56(1):185-192. <https://doi.org/10.1194/jlr.P055640>.

10. Tokushige K, Hashimoto E, Kodama K, et al. Serum metabolomic profile and potential biomarkers for severity of fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol*. 2013;48(12):1392-1400. <https://doi.org/10.1007/s00535-013-0766-5>.
11. Kalhan SC, Guo L, Edmison J, et al. M. Plasma metabolomic profile in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism*. 2011;60:404-413. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2010.03.006>.
12. Safaei A, Oskouie AA, Mohebhi SR, et al. Metabolomic analysis of human cirrhosis, hepatocellular carcinoma, non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis diseases. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*. 2016;9(3):158. PMC4947130.
13. Li L, Huang L, Lemos HP, et al. Altered tryptophan metabolism as a paradigm for good and bad aspects of immune privilege in chronic inflammatory diseases. *Front Immunol*. 2012;3:109. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00109>.
14. Vanholder R, Schepers E, Pletinck A, et al. An update on protein-bound uremic retention solutes. *J Ren Nutr*. 2012;22(1):90-4. <https://doi.org/10.1053/j.jrn.2011.10.026>.
15. Raman M, Ahmed I, Gillevet PM, et al. Fecal microbiome and volatile organic compound metabolome in obese humans with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2013;11(7):868-75.e1-3. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2013.02.015>. Epub 2013 Feb 27.
16. Звенигородская Л.А., Черкашова Е.А., Самсонова Н.Г., и др. Целесообразность применения пробиотиков в лечении атерогенной дислипидемии // Эффективная фармакотерапия. – 2011. – № 7. – С. 46–52. [Zvenigorodskaya LA, Cherkashova YA, Samsonova NG, et al. The expediency of using probiotics in the treatment of atherogenic dyslipidemia. *Effective pharmacotherapy*. 2011;(7):46-52. (In Russ.)]
17. Bessone F, Razori MV, Roma MG. Molecular pathways of nonalcoholic fatty liver disease development and progression. *Cell Mol Life Sci*. 2018 Oct 20. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2947-0>.
18. Wu H, Xue R, Dong L, et al. Metabolomic profiling of human urine in hepatocellular carcinoma patients using gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Chim Acta*. 2009;648(1):98-104. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.06.033>. Epub 2009 June 21.
19. Shinka T, Inoue Y, Ohse M, et al. Rapid and sensitive detection of urinary 4-hydroxybutyric acid and its related compounds by gas chromatography-mass spectrometry in a patient with succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2002;776(1):57-63. [https://doi.org/10.1016/s1570-0232\(02\)00126-5](https://doi.org/10.1016/s1570-0232(02)00126-5).
20. Beloborodova N, Bairamov I, Olenin A, et al. Effect of phenolic acids of microbial origin on production of reactive oxygen species in mitochondria and neutrophils. *J Biomed Sci*. 2012;19:89. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-19-89>.

◆ Адрес автора для переписки (*Information about the author*)

Мадина Петровна Абацьева / Madina Abatsieva

Тел. / Tel.: +7(911)8406515

E-mail: madina.abacieva@mail.ru

ORCID iD: 0000-0002-1989-7546

SPIN-код: 6659-6646