



Уровни жирных кислот сыворотки крови и мембран эритроцитов могут быть использованы как биомаркеры для оценки тяжести НАЖБП

Кручинина М. В.^{1,2}, Паруликова М. В.^{1,3}, Курилович С. А.¹, Громов А. А.¹, Шашков М. В.⁴, Соколова А. С.⁵, Кручинин В. Н.⁶

¹ Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины — филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», ул. Бориса Богаткова, 175/1, Новосибирск, 630089 Россия

² ФГБОУ Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Красный проспект, 52, Новосибирск, 630091 Россия

³ ЧУЗ «Клиническая больница «РЖД-Медицина г. Новосибирск», г. Новосибирск, Владимирский спуск, 2а, Россия

⁴ ФГБУН Институт катализа им. Г. К. Борескова СО РАН, 630090, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 5

⁵ ФГБУН Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН, 630090, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 9

⁶ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физики полупроводников им. А. В. Ржанова Сибирского отделения Российской академии наук, Проспект Академика Лаврентьева, 13, Новосибирск, 630090 Россия

Для цитирования: Кручинина М. В., Паруликова М. В., Курилович С. А., Громов А. А., Шашков М. В., Соколова А. С., Кручинин В. Н. Уровни жирных кислот сыворотки крови и мембран эритроцитов могут быть использованы как биомаркеры для оценки тяжести НАЖБП. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2021;191(7): 12–22. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-191-7-12-22

✉ Для переписки:

**Кручинина
Маргарита Витальевна**
kruchmargo@yandex.ru

Кручинина Маргарита Витальевна, лаборатория гастроэнтерологии, ведущий научный сотрудник, д.м.н.; доцент кафедры пропедевтики внутренних болезней

Паруликова Марина Владимировна, старший преподаватель; зав. отделением гастроэнтерологии

Курилович Светлана Арсентьевна, лаборатория гастроэнтерологии, заведующая лабораторией, д.м.н., профессор

Громов Андрей Александрович, лаборатория клинических биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний, старший научный сотрудник, к.м.н.

Шашков Михаил Вадимович, аналитическая лаборатория, научный сотрудник, кандидат химических наук

Соколова Анастасия Сергеевна, лаборатория физиологически активных веществ, научный сотрудник, кандидат химических наук

Кручинин Владимир Николаевич, старший научный сотрудник, кандидат химических наук

Резюме

Цель работы — изучить возможности использования жирных кислот сыворотки крови (СК) и эритроцитов (Эр) в качестве диагностических маркеров тяжести НАЖБП.

Материалы и методы. Обследованы 52 пациента с НАЖБП ($51,8 \pm 3,9$ года), подтвержденной индексом NLFS, и 20 условно здоровых мужчин ($49,2 \pm 4,5$ года). Степень фиброза печени установлена методом непрямого эластометрии (FibroScan® 502 EchoSens, Франция). У 27 пациентов выявлена начальная степень фиброза (F0–1), 25 имели выраженный фиброз (F2–4). Состав жирных кислот (ЖК) Эр и СК исследован с помощью ГХ/МС системы на основе трех квадруполов Agilent 7000B (США).

Результаты. Выявлены достоверные различия в уровнях жирных кислот сыворотки крови и мембран эритроцитов у пациентов с НАЖБП, ассоциированные со степенью фиброза и некровоспалительной активности. Для различения легкого и выраженного фиброза при НАЖБП оказались значимыми уровни насыщенных ЖК (миристиновая, пентадекановая, маргариновая) и омега-3 ПНЖК (эйкозапентаеновая, докозапентаеновая, докозагексаеновая) ($p=0,002–0,0003$). Для дифференцирования степени некровоспалительной активности (минимальная против выраженной) ключевую роль играли насыщенные и мононенасыщенные ЖК (пальмитэлаидиновая, пальмитолеиновая, вакценовая) ($p=0,03–0,005$).

Созданные диагностические панели (ЖК сыворотки крови и мембран эритроцитов) позволили дифференцировать пациентов с НАЖБП с различной степенью фиброза. Выявлены корреляции уровней ЖК в мембранах эритроцитов и сыворотке крови с проявлениями метаболического синдрома, показателями повреждения печени у пациентов с НАЖБП.

Выводы. Установленные различия в жирнокислотных профилях сыворотки крови и мембран эритроцитов у пациентов с НАЖБП, ассоциированные со степенью фиброза, некровоспалительной активности, проявлениями метаболического синдрома и показателями повреждения печени, следует рассматривать в качестве перспективных биомаркеров для оценки степени тяжести НАЖБП.

Ключевые слова: неалкогольная жировая болезнь печени, диагностика, степень тяжести, жирные кислоты

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

<https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-191-7-12-22>



Serum and erythrocyte membrane fatty acid levels may be used as biomarkers to assess the severity of NAFLD

M. V. Kruchinina^{1,2}, M. V. Parulikova^{1,3}, S. A. Kurilovich¹, A. A. Gromov¹, M. V. Shashkov⁴, A. S. Sokolova⁵, V. N. Kruchinin⁶

¹ Research Institute of Internal and Preventive Medicine — Branch of the Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Bogatkov Str., 175/1, Novosibirsk, 630090, Russia

² Novosibirsk State Medical University, Krasnyi Ave., 52, Novosibirsk, 630091, Russia

³ "RR" OJSK, Railway clinical hospital on the station Novosibirsk-Glavnyi, 630003 Novosibirsk, Vladimirovskiy spusk, 2a, Russia

⁴ Boreskov Institute of Catalysis SB RAS, 630090, Novosibirsk, Lavrentiev Ave. 5, Russia

⁵ Novosibirsk Institute of Organic Chemistry SB RAS, 630090, Novosibirsk, Lavrentiev Ave. 9

⁶ Rzhzanov Institute of Semiconductor Physics SB RAS, Lavrentiev Ave., 13, Novosibirsk, 630090, Russia

For citation: Kruchinina M. V., Parulikova M. V., Kurilovich S. A., Gromov A. A., Shashkov M. V., Sokolova A. S., Kruchinin V. N. Serum and erythrocyte membrane fatty acid levels may be used as biomarkers to assess the severity of NAFLD. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2021;191(7): 12–22. (In Russ.) DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-191-7-12-22

Margarita V. Kruchinina, MD; Leading researcher of Laboratory of Gastroenterology; Associate Professor of Department for Propaedeutics of Internal Medicine; ORCID: 0000-0003-0077-3823

Marina V. Parulikova, Senior Lecturer; head Department of Gastroenterology

Svetlana A. Kurilovich, Head of Laboratory of Gastroenterology, MD; Department of Therapy, Hematology and Transfusiology (Faculty of Continuing Education and Retraining of Doctors), Professor

Andrey A. Gromov, Laboratory of Clinical Biochemical and Hormonal Research of Therapeutic Diseases, Senior Researcher, Ph.D

Mikhail V. Shashkov, Researcher, PhD

Anastasia S. Sokolova, Researcher, PhD

Vladimir N. Kruchinin, PhD; Researcher of laboratory of Ellipsometry, ORCID: 0000-0002-9905-9031

✉ **Corresponding author:**

Margarita V. Kruchinina
kruchmargo@yandex.ru

Summary

The aim of this work is to study the possibility of using blood serum (BS) fatty acids (FA) and erythrocytes (ER) as diagnostic markers of the severity of NAFLD.

Materials and methods. We examined 52 patients with NAFLD (51.8 ± 3.9 years), confirmed by the NLFS index, and 20 apparently healthy men (49.2 ± 4.5 years). The degree of liver fibrosis was established by indirect elastometry (FibroScan® 502 Echosens, France). 27 patients had an initial degree of fibrosis (F0–1), 25 had severe fibrosis (F2–4). The study of the composition of fatty acids of Er and BS was carried out using a GC / MS system based on three Agilent 7000B quadrupoles (USA).

Results. Significant differences in the levels of fatty acids in blood serum and erythrocyte membranes in patients with NAFLD were revealed, associated with the degree of fibrosis and necroinflammatory activity. To distinguish between mild and severe fibrosis in NAFLD, the levels of saturated fatty acids (myristic, pentadecane, margarine) and omega-3 PUFAs (eicosapentaenoic, docosapentaenoic, docosahexaenoic) were found to be significant ($p = 0.002–0.0003$). Saturated and monounsaturated FAs (palmitelaidic, palmitoleic, vaccenic) played a key role in differentiating the degree of necroinflammatory activity (minimal versus pronounced) ($p = 0.03–0.005$).

The created diagnostic panels (FA of blood serum and erythrocyte membranes) made it possible to differentiate patients with NAFLD with varying degrees of fibrosis. Correlations of FA levels in erythrocyte membranes and blood serum with manifestations of metabolic syndrome, indicators of liver damage in patients with NAFLD were revealed.

Conclusions. The established differences in fatty acid profiles of blood serum and erythrocyte membranes in patients with NAFLD, associated with the degree of fibrosis, necroinflammatory activity, manifestations of metabolic syndrome and indicators of liver damage, should be considered as promising biomarkers for assessing the severity of NAFLD.

Keywords: non-alcoholic fatty liver disease, diagnosis, severity, fatty acids

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest.

Введение

К настоящему времени неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП) является одним из лидирующих заболеваний печени во всем мире. Первичная НАЖБП определяется как стеатоз печени, доказанный с помощью биопсии или методов визуализации, при отсутствии значительного потребления алкоголя, вирусного гепатита, стеатогенных лекарств или врожденных метаболических нарушений [1]. НАЖБП была предложена в качестве печеночного проявления метаболического синдрома [2–4]. НАЖБП представлена в виде спектра гистологических состояний от изолированного стеатоза до воспаления печени, известного как неалкогольный стеатогепатит (НАСГ). В патогенезе НАЖБП ключевую роль играет увеличение поступления свободных жирных кислот (СЖК) в печень, снижение скорости β -окисления СЖК и повышение синтеза жирных кислот в митохондриях печени. СЖК являются высокоактивным субстратом перекисного окисления липидов (ПОЛ). Основанием рассматривать ПОЛ как универсальный патогенетический механизм развития НАСГ служит тот факт, что эффектами ПОЛ можно объяснить основную часть наблюдаемых при стеатогепатите воспалительно-некротических изменений в печени [5]. НАСГ может прогрессировать до развития цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы [6], поэтому усилия по диагностике и лечению должны быть направлены на людей с этой патологией [6, 7]. Диагностика НАЖБП включает в себя перечень визуализирующих методов, начиная с УЗИ-исследования – признанного скринингового метода диагностики жирового гепатоза, заканчивая транзитной эластографией

с CAP-функцией, магнитно-резонансной эластографией. Предложены сывороточные тесты, позволяющие выявить как наличие стеатоза (*Steato Test* в составе *FibroMax*), так и стеатогепатита (*Nash Test*), степени фиброза у пациентов с НАЖБП (*NAFLD fibrosis score*, *FIB-4* индекс, *APRI*, *Fibrometer*, *Fibro Test*, *Hepascore*, *ELF panel*) [8]. Несмотря на имеющиеся неинвазивные диагностические возможности в ряде случаев для верификации НАСГ необходима биопсия печени. Известно, что биопсия печени имеет ряд ограничений, в том числе ошибки выборки, высокая стоимость и риск осложнений. Кроме того, невозможно выполнить биопсию печени у всех пациентов с НАЖБП [9, 10].

В патогенезе НАЖБП, развитии и прогрессировании НАСГ остается целый ряд неясных аспектов. Накопление липидов является центральной особенностью НАЖБП и обусловлено множеством факторов, начиная от увеличения потока жирных кислот и заканчивая липогенезом *de novo*. Повышенный липогенез является основной характеристикой НАЖБП и, по-видимому, является более важным источником стеатоза, чем избыточное поступление липидов в составе диеты [11, 12]. Muir K. и соавт. на мышинной модели НАСГ показали, что у животных, получавших регулярную диету, развивались изменения как в составе печеночных, так и циркулирующих жирных кислот, в соответствии с важной ролью липогенеза *de novo* при НАСГ [13].

Цель работы – изучить возможности использования жирных кислот сыворотки крови (СК) и эритроцитов (Эр) в качестве диагностических маркеров тяжести НАЖБП.

Материалы и методы

Обследованы 52 пациента с НАЖБП ($51,8 \pm 3,9$ года), подтвержденной индексом NLFS, и 20 условно здоровых мужчин ($49,2 \pm 4,5$ года). Степень фиброза печени установлена методом непрямой эластометрии (*FibroScan® 502 Echosens*, Франция). У 27 пациентов выявлена начальная степень фиброза ($F0-1$), 25 имели выраженный фиброз ($F2-4$). Степень некровоспалительной активности определена с помощью алгоритма АктивТест в составе ФиброТеста (*BioPredictive*, Франция), предполагающим

определение 6 биохимических параметров – альфа2-макроглобулин, гаптоглобин, аполипопротеин A1, общий билирубин, ГГТП, АЛТ. Пациенты были разделены на две группы по степени активности некровоспалительного процесса: первая группа с минимальной гистологической активностью – $A0-1$ ($n=39$), вторая – с выраженной $A2-3$ с выраженной некровоспалительной активностью ($n=13$). Исследование состава жирных кислот (ЖК) Эр и СК проведено с помощью ГХ/МС системы

на основе трех квадруполой *Agilent 7000B* (США). Концентрации жирных кислот мембран эритроцитов и сыворотки крови выражали в относительных процентах. Предел обнаружения жирной кислоты ~ 1 мкг на образец. Подробное описание пробоподготовки для исследования жирных кислот и процесса их определения представлено в работе [14].

Для статистического анализа использовано программное обеспечение *SPSS, ver.17*. Для сравнения между двумя независимыми группами применен t-тест Стьюдента, t-тест *Welch*, тест *Mann-Whitney U* и / или тест хи-квадрат. Для сравнения параметров между тремя независимыми группами использован *ANOVA* с последующим тестом *Tukey HSD*. Во всех процедурах статистического анализа критический уровень значимости нулевой гипотезы (p) принимался равным 0,05. Ранговые

коэффициенты корреляции Спирмена использовались для оценки корреляций между дискретными переменными. Для создания диагностических панелей использован метод *Volcano plot*. Оценка диагностической точности панелей показателей произведена с помощью *ROC*-анализа.

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 г. № 266.

Результаты

Клинико-биохимическая характеристика пациентов с НАЖБП с разной степенью фиброза представлена в таблице 1. Пациенты с НАЖБП оказались сопоставимы с группой контроля по возрасту и имели проявления метаболического синдрома: достоверно более высокие значения ИМТ, окружности талии, показателей липидного спектра, уровня глюкозы, индекса НОМА, уровней мочевой кислоты, ферритина по сравнению с группой контроля ($p < 0,05 - 0,001$). Выраженность проявлений по ряду биохимических параметров оказалась большей при выраженном фиброзе по сравнению с начальными стадиями. Пациенты с НАЖБП с *F2-F4* отличались от таковых

с *F0-F1* большими сдвигами в уровнях печеночных проб, в том числе, отражающих белоксинтетическую функцию печени (уровень альбумина), синдромы цитолиза, холестаза (активности трансаминаз, ГГТП, ЩФ, уровень билирубина, его фракций, железа сыворотки), иммуно-воспалительного синдрома (уровень тимоловой пробы) ($p < 0,05 - 0,001$).

Пациенты с НАЖБП с различной степенью фиброза различались по уровням насыщенных и полиненасыщенных омега 3 жирных кислот в мембранах эритроцитов и сыворотке крови.

В сыворотке крови уровни пентадекановой (C15:0), докозопентаеновой (C22:5 n3) оказались

Показатели	Группа сравнения, n=20	1-я группа НАЖБП с F0-F1 n=27	2-я группа НАЖБП с F2-F4 n=25
Возраст, (годы)	54,7 ± 1,3	55,8 ± 2,1	57,9 ± 1,3
ИМТ, (кг/м.кв.)	24,2 ± 1,3	34,2 ± 0,86 **	29,8 ± 1,0*^
Окружность талии, (ОТ) (см)	90 ± 10	120 ± 11 *	117 ± 7 *
Общий холестерин, (мг/дл)	165,7 ± 6,3	215,1 ± 6,9**	233,0 ± 9,3***^
Холестерин ЛПВП, (мг/дл)	53,2 ± 1,4	49,6 ± 1,5 **	41,4 ± 1,7***^
Холестерин ЛПНП, (мг/дл)	112,6 ± 2,0	169,3 ± 2,5 *	147,5 ± 3,9***^
Триглицериды, (мг/дл)	145,5 ± 11,6	232,4 ± 12,2 *	209,6 ± 21,5***^
Глюкоза крови натощак, (ммоль/л)	4,5 ± 1,1	6,74 ± 0,28*	6,62 ± 0,26*
НОМА индекс	2,1 ± 0,6 ^^	7,5 ± 1,0	9,2 ± 0,8**
Общий белок, (г/л)	74,5 ± 0,9	72,8 ± 0,7	73,1 ± 0,8
Альбумин, (г/л)	44,6 ± 0,8	43,4 ± 0,6	39,5 ± 0,8*
АЛТ, (Ед./л)	14,2 ± 1,4	27,9 ± 2,6 **	50,57 ± 5,6***^
АСТ, (Ед./л)	12,7 ± 2,2	23,9 ± 1,5**	55,75 ± 7,7***^
ГГТП, (Ед./л)	15,3 ± 1,8	40,8 ± 6,6 ***	47,2 ± 11,1***
ЩФ, (Ед./л)	124,2 ± 5,3	179,7 ± 6,6 **	233,0 ± 16,3***^
АМК, (Ед./л)	47,2 ± 5,1	56,1 ± 7,6	64,8 ± 4,8
Общий билирубин, (мкмоль/л)	11,9 ± 0,9	12,3 ± 0,8 *	18,6 ± 2,3*
Прямой билирубин, (мкмоль/л)	3,6 ± 0,5	5,5 ± 0,3***	9,1 ± 1,9***^
Тимоловая проба, (ед.)	1,1 ± 0,9	3,5 ± 1,6	4,7 ± 1,5***^
Мочевая кислота, (мг/дл)	167,7 ± 11,5	331,7 ± 16,1*	377,8 ± 18,8***^
Креатинин, (мкмоль/л)	57,7 ± 1,8	76,8 ± 1,2*	85,0 ± 2,4***^
Мочевина, (ммоль/л)	5,3 ± 1,8	6,2 ± 1,9	7,3 ± 2,1*^
Ферритин, (мкг/л)	90,7 ± 12,5	211,3 ± 11,2 **	314,8 ± 10,9** ^
Железо сыворотки, (мкмоль/л)	10,3 ± 1,4	14,9 ± 1,2	16,7 ± 1,9***^
ОЖСС, (мг/дл)	59,7 ± 3,8	66,9 ± 10,7	53,0 ± 3,0

Таблица 1.
Клинико-биохимическая характеристика пациентов с НАЖБП с разной степенью фиброза и лиц группы сравнения (M±SD).

Примечание:

1. М – средняя арифметическая вариационного ряда, SD – среднее квадратическое отклонение.

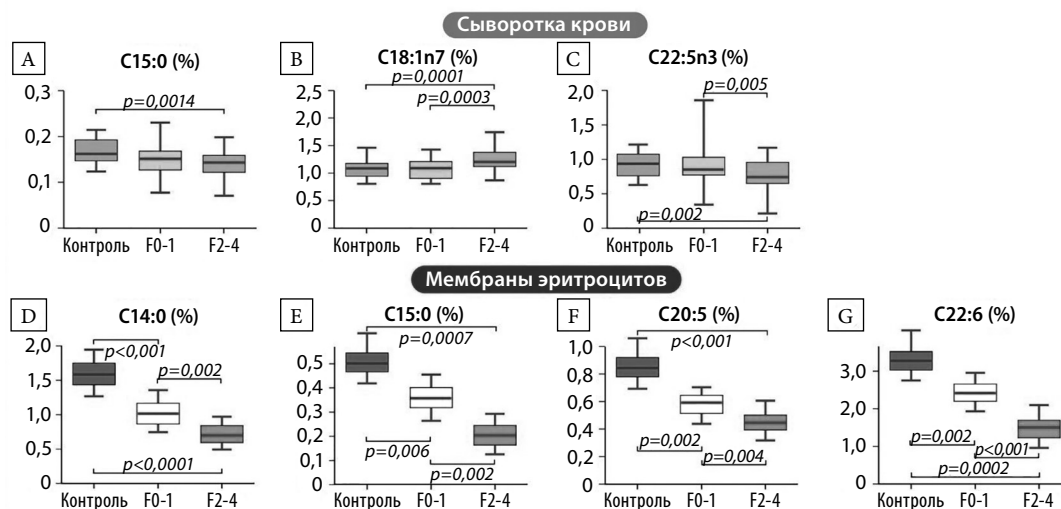
2. Достоверность различий между группами:

- статистическая значимость отличия от группы сравнения (– $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$);

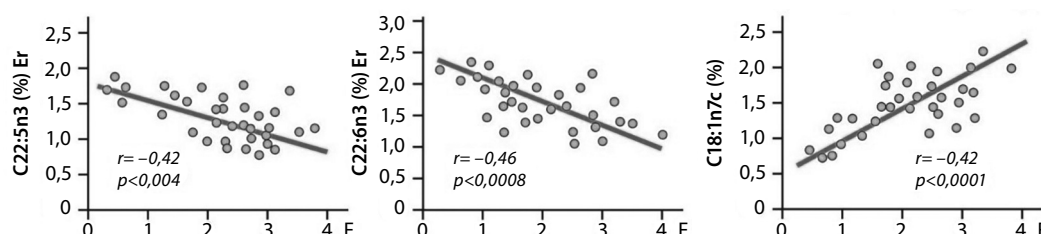
^ – статистическая значимость отличия от 1 группы с НАЖБП (^ – $p < 0,05$, ^^ – $p < 0,01$, ^^ – $p < 0,001$).

Рисунок 1.

Уровни жирных кислот в сыворотке крови и мембранах эритроцитов у пациентов с НАЖБП с разной степенью фиброза (F0–1–начальная степень фиброза, F2–4 – выраженные степени фиброза).

**Рисунок 2.**

Корреляции уровней ЖК мембран эритроцитов (%) со степенью фиброза печени.



достовременно ниже ($p=0,0004$ и $p=0,005$, соответственно), а вакценовой (C18:1n7c) – выше у пациентов с выраженным фиброзом по сравнению с минимальным ($p=0,0003$). В мембранах эритроцитов дополнительно выявлены жирные кислоты, позволяющие различить степени фиброза печени: содержание миристиновой (C14:0) и двух омега-3 ПНЖК – эйкозапентаеновой (C20:5 n3) и докозагексаеновой (C22:6 n3) были ниже в случаях продвинутого фиброза, чем при невыраженном фиброзе и у здоровых лиц ($p=0,0001-0,002$) (см. рисунок 1).

Установлены прямые корреляции уровня C18:1n7c со степенью фиброза печени, ассоциации с уровнями омега-3 ПНЖК (C22:5 n3, C22:6 n3) оказались обратными (см. рисунок 2).

В группах пациентов с НАЖБП с различной степенью некровоспалительной активности выявлены достоверные отличия по уровням ряда насыщенных и мононенасыщенных ЖК в мембранах эритроцитов. При этом содержание миристиновой ЖК (C14:0), пентадекановой (C15:0), маргаритиновой (C17:0), пальмитэлаидиновой (C16:1n7t) было ниже у пациентов с выраженной гистологической активностью по сравнению с минимальной ($p=0,0004-0,006$). Напротив, уровни пальмитолеиновой (C16:1n7c) и вакценовой (C18:1n7c) оказались достоверно выше при выраженной некровоспалительной активности, чем в случаях A0–1 и у здоровых лиц ($p=0,005-0,03$) (см. рисунок 3).

Наиболее тесные обратные корреляции со степенью некровоспалительной активности выявлены с уровнями насыщенных пентадекановой, маргаритиновой и мононенасыщенной пальмитэлаидиновой (C16:1n7t), связь с уровнем C18:1n7c оказалась прямой (см. рисунок 4).

Установлены обратные корреляции ряда показателей метаболического синдрома (окружности талии, НОМА индекса) с суммарным содержанием ПНЖК, отношением докозагексаеновой к докозапентаеновой ЖК в мембранах эритроцитов. Уровень глюкозы крови натощак оказался обратно связанным с уровнем пентадекановой ЖК (см. рисунок 5).

Выявлены ассоциации показателей печеночных проб с уровнями ряда жирных кислот мембран эритроцитов: уровни активности трансаминаз обратно коррелировали с содержанием насыщенных ЖК (C15:0, C17:0) и прямо – с мононенасыщенной – C16:1n7c. Уровень ферритина оказался прямо связанным с содержанием C18:1n7c и обратно – с уровнем омега-3 докозагексаеновой кислоты. Уровень альбумина оказался ассоциирован с содержанием C22:5 n3 (см. рисунок 6).

Перечень 6 параметров, представляющих уровни отдельных ЖК, которые отвечают требованиям для дифференцирующих биомаркеров (фиброз 0–1 степени против фиброза 2–4 степени)

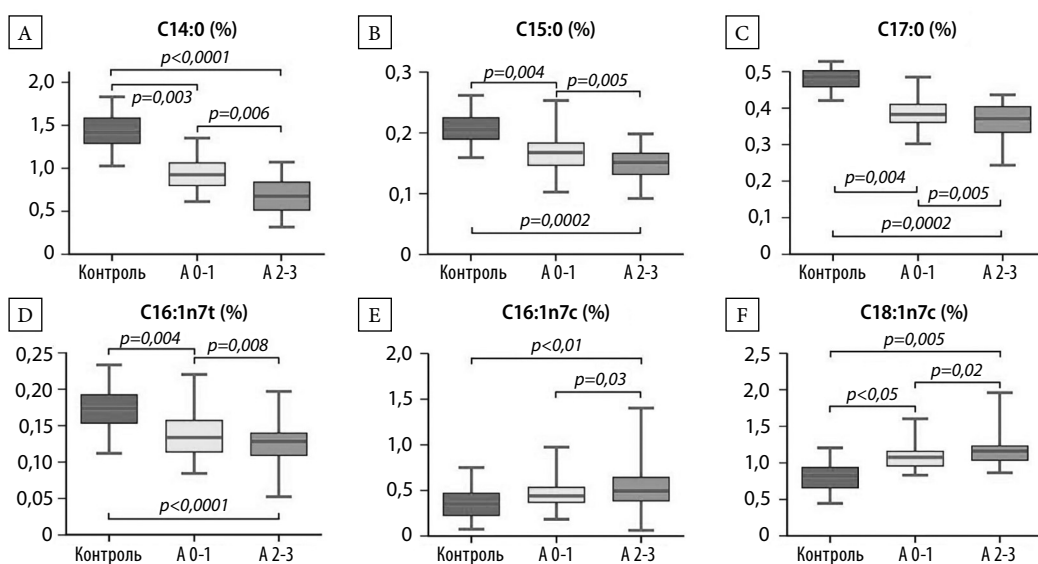


Рисунок 3. Уровни жирных кислот в мембранах эритроцитов у пациентов с НАЖБП с разной степенью некро-воспалительной активности (A0-1-начальная степень некровоспалительной активности, A2-3 – выраженные степени некровоспалительной активности).

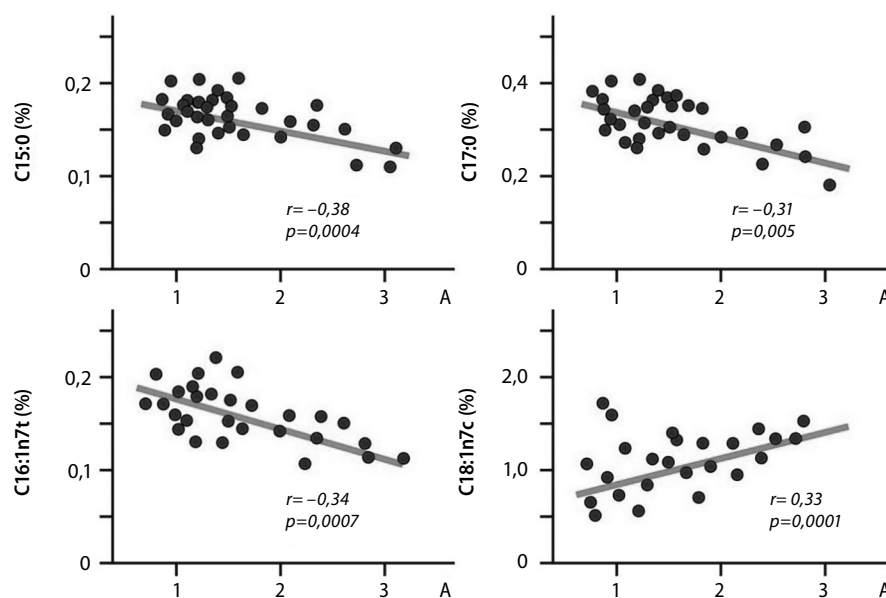


Рисунок 4. Корреляции уровней ЖК мембран эритроцитов (%) со степенью некровоспалительной активности.

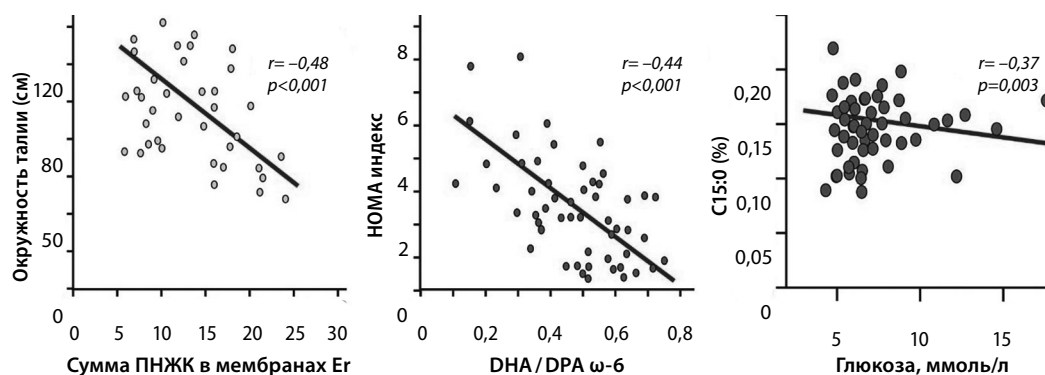


Рисунок 5. Корреляции уровней ЖК мембран эритроцитов (%) с показателями метаболического синдрома.

Рисунок 6.
Корреляции уровней ЖК мембран эритроцитов (%) с показателями печеночных проб.

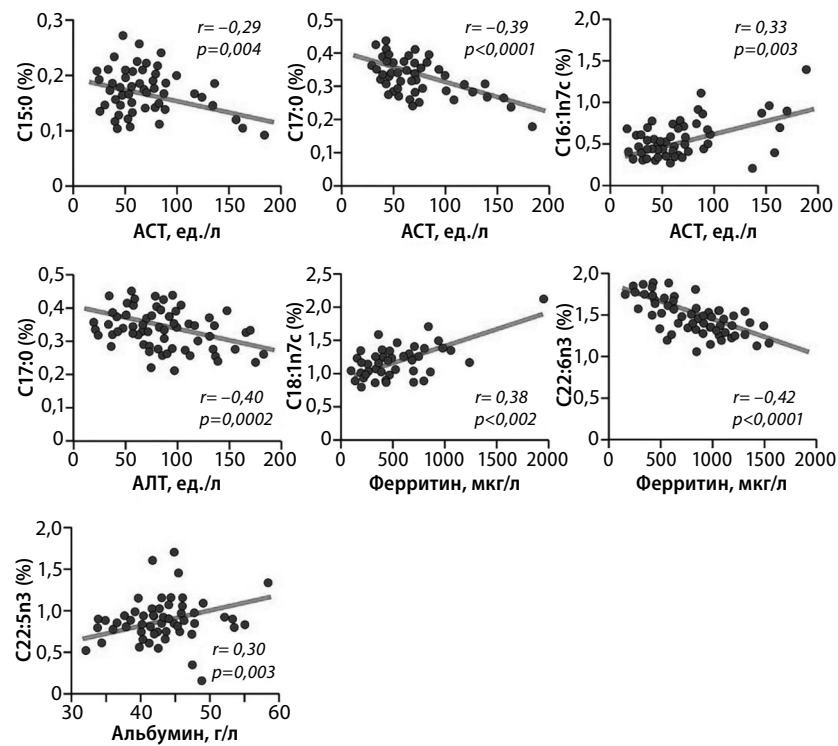


Таблица 2.
Жирные кислоты мембран эритроцитов и сыворотки крови – потенциальные биомаркеры для различия F0–1 и F2–4 (данные получены при использовании Volcano plot).

Примечание:
S – жирные кислоты сыворотки крови; E – жирные кислоты мембран эритроцитов.

Название жирных кислот	Кратность изменений (FC)	log2 (FC)	Значения «p» (raw.p val.)	-log10 (p)
S C18:1n7c вакценовая	1,7846	0,78312	0,000354	3,6702
E C22:6n-3 докозагексаеновая	0,59087	-0,75909	0,001147	2,87113
E C15:0 пентадекановая	0,71932	-0,47164	0,002314	2,20381
E C20:5n3 эйкозапентаеновая	0,61763	-0,69518	0,004061	2,7581
S C22:5n3 докозапентаеновая	0,60412	-0,72709	0,005307	2,6214
E C16:1n7t пальмитэлаидиновая	0,71843	-0,51347	0,013472	1,92671

представлены в таблице 2. Данные получены при применении Volcano plot.

Из данных таблицы 2 следует, что уровни эритроцитарных пентадекановой, пальмитэлаидиновой, эйкозапентаеновой, докозагексаеновой, сывороточной докозапентаеновой (содержание которых достоверно ниже при выраженном фиброзе F2–4, чем при начальном F0–1) и сывороточный уровень вакценовой ЖК, содержание которой достоверно выше при F2–4, чем при F0–1 являются дифференцирующими при различении начального и выраженного фиброза.

Перечень ЖК мембран эритроцитов, позволяющих дифференцировать начальные степени некровоспалительной активности от выраженных, представлены в таблице 3.

Уровни насыщенных ЖК мембран эритроцитов – миристиновой, пентадекановой, маргариновой, содержание которых было ниже при выраженной некровоспалительной активности, чем при

начальной, и мононенасыщенных ЖК – пальмитолеиновой, вакценовой, уровни которых выше при A2–3, чем A0–1, оказались дифференцирующими при различении степеней некровоспалительной активности.

Перечисленные выше ЖК вошли в состав моделей, для различения пациентов с НАЖБП с различной степенью фиброза и некровоспалительной активностью. Проведенный ROC-анализ (см. рисунок 7) позволил достичь AUC 0,93 с чувствительностью 0,84, специфичностью 0,92 при использовании модели 1, состоящей из уровней ЖК СК и мембран Эр – C15:0, C18:1n7c, C16:1n7t, 20:5n3, 22:5n3, 22:6n3, для различения F0–1 от F2–4.

Панель 2, состоящая из уровней C14:0, C15:0, C17:0, C16:1n7c, C18:1n7c, обеспечила AUC 0,86 с чувствительностью 0,80, специфичностью 0,86 при различении начальной некровоспалительной активности A0–1 у пациентов с НАЖБП от выраженной A2–3.

Название жирных кислот	Кратность изменений (FC)	log2 (FC)	Значения «p» (raw. p val.)	-log10 (p)
C15:0 пентадекановая	0,75774	-0,40022	0,005112	2,7921
C17:0 маргариновая	0,66007	-0,5993	0,005421	2,6231
C14:0 миристиновая	0,61763	-0,69518	0,006347	2,4931
C18:1n7c вакценовая	1,32141	0,40117	0,02113	1,5141
C16:1n7c пальмитолеиновая	1,75147	0,41524	0,032901	1,3093

Таблица 3.
Жирные кислоты мембран эритроцитов – потенциальные биомаркеры для различия A0–1 и A2–3 (данные получены при использовании Volcano plot).

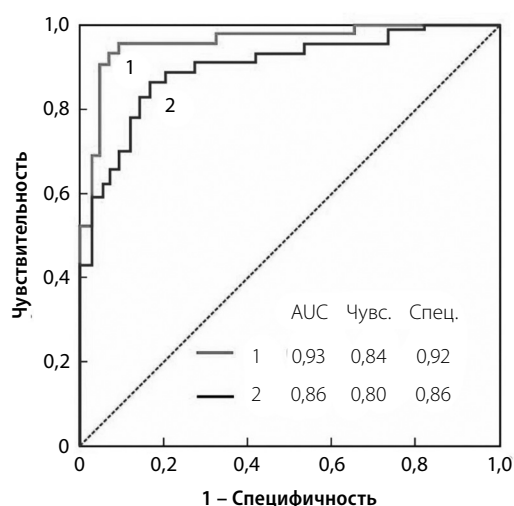


Рисунок 7.
ROC-кривые при дифференцировании пациентов с разной степенью фиброза и некро-воспалительной активности: панель 1 – различие степени фиброза печени у пациентов с НАЖБП F0–1 против F2–4: уровни ЖК СК и мембран Эр – C15:0, C18:1n7c, C16:1n7t, 20:5n3, 22:5n3, 22:6n3; панель 2 – различие степени некровоспалительной активности у пациентов с НАЖБП A0–1 против A2–3: C14:0, C15:0, C17:0, C16:1n7c, C18:1n7c.

Обсуждение

Ключевой проблемой в диагностировании и лечении НАЖБП является различие НАСГ от простого стеатоза и надежная оценка стадии заболевания. Неалкогольный стеатоз и неалкогольный стеатогепатит являются стадиями заболевания в спектре НАЖБП. Системы оценки, базирующиеся на клинических и лабораторных показателях или данных методов визуализации могут помочь в предсказании НАСГ, но ни один из методов не может заменить биопсию печени [15, 16]. Сохраняется большая потребность в неинвазивных диагностических подходах для дифференцирования стеатоза от неалкогольного стеатогепатита, как в установлении наличия, так и при определении степени фиброза печени.

В настоящей работе выполнен анализ уровней жирных кислот мембран эритроцитов и сыворотки крови у пациентов с НАЖБП, установлены корреляции полученных уровней ЖК с биохимическими параметрами повреждения печени, проявлениями метаболического синдрома. Нами созданы панели из ЖК сыворотки крови и мембран эритроцитов,

которые могут использоваться для выявления НАСГ среди пациентов с НАЖБП. Они включают в себя насыщенные ЖК с нечетным числом атомов углерода: C15:0 (пентадекановая) и C17:0 (маргариновая), мононенасыщенные ЖК – C16:1n7t (пальмитэлаидиновая), C16:1n7c (пальмитолеиновая), C18:1n7c (вакценовая) и омега 3 ПНЖК – 20:5n3 (эйкозапентаеновая), C22:5 n3 (докозапентаеновая), 22:6n3 (докозагексаеновая).

Большая часть исследований последних лет, посвященных поиску биомаркеров, отражающих гистологические особенности печени при НАЖБП, не включала изучение уровней жирных кислот мембран эритроцитов и сыворотки крови [17–24].

В ряде работ использованы липидомические или метаболомические подходы, в частности, Zhou Y. et al. продемонстрировали использование панели из трех метаболитов и двух липидов в сочетании с вариантом гена *PNPLA3* для выявления НАСГ (AUROC 0,86) [24]. В ходе выполнения некоторых исследований проводились определения уровней ряда ЖК в плазме крови или в печени у пациентов

с НАЖБП. В работе Yoo W. et al. было проанализировано 46 различных циркулирующих ЖК [25]. Авторами установлено, что уровни C15:0, C17:0 и C16:1n7t обратно коррелировали с данными *NAFLD Activity Score (NAS)* (шкала суммарной оценки стеатоза, лобулярного воспаления и баллонной дистрофии при морфологическом исследовании биоптата печени) и баллами по шкале баллонизации, в то время как уровни C18:1n7c тесно коррелировали со шкалой степени фиброза печени. Панель, сформированная из уровней этих ЖК, возраста, уровня ферритина и индекса отношения активности АСТ к количеству тромбоцитов, позволила различать пациентов с умеренным и продвинутым фиброзом с *AUROC* 0,92.

По данным Puri P. et al. в липидных фракциях триглицеридов печени у пациентов с НАЖБП выявлены сниженные уровни арахидоновой кислоты (C20:4n6), эйкозапентаеновой (C20:5n3) и докозагексаеновой (C22:6n3) [26]. Yamada K. et al. при изучении состава жирных кислот в ткани печени выявили повышенный уровень C16:1n7c у пациентов с НАСГ [27]. Только в работе Puri P. et al. было выполнено изучение ЖК плазмы крови, в нем определены повышенные уровни циркулирующей C16:1n7c (пальмитолеиновой кислоты) и десатуразной активности у больных с НАЖБП по сравнению со здоровым контролем [28].

В настоящей работе выявлен сниженный уровень ряда омега 3 ПНЖК у пациентов НАЖБП, особенно с выраженным фиброзом печени, что согласуется с данными Zhou Y. et al., которые установили сниженные уровни C20:5n3 и C22:6n3 в ткани печени при НАЖБП [24], а также с результатами Yoo W. и соавт., которые обнаружили сниженное содержание циркулирующей C22:5n3, ассоциированное со степенью фиброза [25].

В ряде недавних исследований изучены эффекты омега-3 ПНЖК у пациентов с НАЖБП, которые следует считать перспективными [29, 30]. Показано, что добавление омега 3 ПНЖК в диету может снизить уровень жира в ткани печени [31, 32]. Но в работах не установлено влияние этих кислот на снижение степени фиброза печени или иные метаболические воздействия [32, 33]. Поскольку авторами исследованы преимущественно эйкозапентаеновая и докозагексаеновая кислоты, остается открытым вопрос определения оптимального состава омега 3 ПНЖК (с использованием и других соединений) в качестве средств терапии. Особенно интересно оценить эффект подобного назначения при различных вариантах компонентов НАЖБП (стеатоз, воспаление, фиброз).

В настоящей работе выявлены сниженные уровни насыщенных ЖК с нечетным числом атомов углерода – C15:0 и C17:0 и транс-мононенасыщенной ЖК C16:1n7t. Первоначально считалось, что уровень насыщенных ЖК с нечетным числом атомов углерода C15:0 и C17:0 в основном связан с потреблением молочного жира и ассоциирован с их биосинтезом микробиомом жвачных животных [34, 35]. Содержание C16:1n7t также связывали с потреблением молочного жира. В молочном жире

отношение C15:0 к C17:0 составляет примерно 2:1, в то время как в тканях и биологических жидкостях человека то же соотношение равно 1:2, что противоречит гипотезе о диете как единственном источнике этих жирных кислот [34].

Результаты недавних исследований показали, что биосинтез ЖК с нечетным числом атомов углерода может происходить путем β -окисления в жировой ткани. Было показано, что уровень как C15:0, так и C17:0, прямо ассоциирован с состоянием здоровья, в частности, с риском развития сахарного диабета 2 типа и сердечно-сосудистой патологией [34, 36–38].

Yoo W. Et al. на мышинной модели НАСГ показали, что эти кислоты модулируют апоптоз, диета с их добавлением снижает выраженность баллонной дистрофии гепатоцитов. [25] Авторы продемонстрировали, что C15:0 является регулятором повреждения печени, подтвержденного уровнем активности АСТ, и, что добавление C15:0 в диету снижает число цероид-нагруженных макрофагов. Напротив, добавление в диету мышей C18:1n7c не показало значимых изменений параметров НАСГ. Можно предположить, что добавление в диету C15:0 может снизить степень воспаления в печени и ее повреждения при НАСГ, эту жирную кислоту в будущем следует рассматривать как терапевтический подход для предупреждения прогрессии в НАСГ у пациентов с НАЖБП.

В настоящем исследовании выявлены прямые корреляции между уровнями C18:1n7c и степенью фиброза печени, между уровнями C15:0, C17:0 и активностью АЛТ и АСТ, которые отражают функцию печени (обратные корреляции). Интересно, что содержание C18:1n7c оказалось прямо, а уровень C22:6n3 – обратно – ассоциированы с уровнями ферритина. Сывороточные уровни ферритина обычно оценивают у пациентов с НАЖБП в связи с системным воспалением и повышенными запасами железа. По данным Kowdley K. V. et al. повышенный уровень ферритина сыворотки был независимо ассоциирован с более высоким индексом NAS даже среди пациентов без накопления железа в печени. Авторы рассматривают его как независимый предиктор выраженности гистологической активности и продвинутого фиброза у пациентов с НАЖБП [39].

Созданные пилотные диагностические модели для различения пациентов с различными степенями фиброза и некровоспалительной активности позволили выявить новые маркеры для оценки степени тяжести НАЖБП. По уровню диагностической точности эти панели сопоставимы с описанными ранее панелями биомаркеров и шкалами оценки, представленными в систематических обзорах и данных метаанализов [40]. Созданные панели необходимо оценить в проспективных когортах на их применимость для различения гистологической активности, степени фиброза у пациентов с НАЖБП. Необходимы дополнительные исследования для оценки возможности применения идентифицированных перечней ЖК в диагностике пациентов с НАСГ среди лиц с НАЖБП.

Заключение

Выявлены достоверные различия в уровнях жирных кислот сыворотки крови и мембран эритроцитов у пациентов с НАЖБП, ассоциированные со степенью фиброза и некровоспалительной активности. Для различения легкого и выраженного фиброза при НАЖБП оказались значимыми уровни насыщенных ЖК (миристиновая, пентадекановая, маргариновая) и омега-3 ПНЖК (эйкозапентаеновая, докозапентаеновая, докозагексаеновая). Для дифференцирования степени некровоспалительной активности (минимальная против выраженной) ключевую роль играли насыщенные и моновенасыщенные ЖК (пальмитэлаидиновая, пальмитолеиновая, вакценовая).

Созданные диагностические панели (ЖК сыворотки крови и мембран эритроцитов) позволили дифференцировать пациентов с НАЖБП с различной степенью фиброза – легкий против

продвинутого (F0–1 против F2–4) (панель 1) (AUC 0,93, чувс. 0,84, спец. 0,92) и пациентов с НАЖБП с различной степенью некровоспалительной активности – минимальная против выраженной (A0–1 против A2–3) (панель 2) (AUC 0,86, чувс. 0,80, спец. 0,86).

Выявлены корреляции уровней ЖК в мембранах эритроцитов и сыворотке крови с проявлениями метаболического синдрома, показателями повреждения печени у пациентов с НАЖБП.

Установленные различия в жирнокислотных профилях сыворотки крови и мембран эритроцитов у пациентов с НАЖБП, ассоциированные со степенью фиброза, некровоспалительной активности, проявлениями метаболического синдрома и показателями повреждения печени, следует рассматривать в качестве перспективных биомаркеров для оценки степени тяжести НАЖБП.

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 | References

- Chalasani N., Younossi Z., Lavine J. E., Diehl A. M., Brunt E. M., Cusi K., et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology* (Baltimore, Md). 2012; 55(6):2005–23.
- Schattenberg J. M., Schuppan D. Nonalcoholic steatohepatitis: the therapeutic challenge of a global epidemic. *Current Opinion In Lipidology*. 2011;22(6):479–88.
- Masuoka H. C., Chalasani N. Nonalcoholic fatty liver disease: an emerging threat to obese and diabetic individuals. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2013, Vol. 1281, pp. 106–22.
- Sookoian S., Pirola C. J. NAFLD. Metabolic make-up of NASH: from fat and sugar to amino acids. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2014;11(4): 205–207.
- Liver Disease: A Manual. – 4th ed., Rev. and additional; Moscow. JSC «Publishing House «Medicine», 2005. 768 p.
Болезни печени: Руководство. – 4-е изд., перераб. и доп.; М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. – 768 с.
- Paredes A. H., Torres D. M., Harrison S. A. Nonalcoholic fatty liver disease. *Clinics in liver disease*. 2012;16(2): 397–419.
- Sanyal A. J., Abdelmalek M. F., Suzuki A., Cummings O. W., Chojkier M., Group E-AS. No significant effects of ethyl-eicosapentanoic acid on histologic features of nonalcoholic steatohepatitis in a phase 2 trial. *Gastroenterology*. 2014;147(2): 377–84.
- Chalasani N., Younossi Z., Lavine J. E., Diehl A. M., Brunt E. M., Cusi K., Charlton M., Sanyal A. J. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology*. 2012;55(6): 2005–2023.
- Pearce S. G., Thosani N. C., Pan J. J. Noninvasive biomarkers for the diagnosis of steatohepatitis and advanced fibrosis in NAFLD. *Biomarker Research*. 2013;1(1): 7.
- Sumida Y., Nakajima A., Itoh Y. Limitations of liver biopsy and non-invasive diagnostic tests for the diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease / nonalcoholic steatohepatitis. *World journal of gastroenterology*. WJG. 2014; 20(2): 475–85.
- Lambert J. E., Ramos-Roman M. A., Browning J. D., Parks E. J. Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2014;146(3):726–735.
- Donnelly K. L., Smith C. I., Schwarzenberg S. J., Jessurun J., Boldt M. D., Parks E. J. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(5):1343–1351.
- Muir K., Hazim A., He Y., Peyressatre M., Kim D. Y., Song X., et al. Proteomic and lipidomic signatures of lipid metabolism in NASH-associated hepatocellular carcinoma. *Cancer research*. 2013;73(15) 4722–4731.
- Kruchinina M. V., Kruchinin V. N., Prudnikova Ya. I., Gromov A. A., Shashkov M. V., Sokolova A. S. Study of the level of fatty acids in erythrocyte membranes and serum of patients with colorectal cancer in novosibirsk. *Advances in Molecular Oncology*. 2018;5(2):50–61. (In Russ.) doi: 10.17650/2313–805X-2018–5–2–50–61
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 молекулярной онкологии. – 2018. – Т. 5, № 2. – С. 50–61.

15. Adams L. A., Feldstein A. E. Non-invasive diagnosis of nonalcoholic fatty liver and nonalcoholic steatohepatitis. *Journal of digestive diseases*. 2011;12(1):10–16.
16. Grandison G. A., Angulo P. Can NASH be diagnosed, graded, and staged noninvasively? *Clinics in liver disease*. 2012;16(3):567–85.
17. Feldstein A. E., Lopez R., Tamimi T. A., Yerian L., Chung Y. M., Berk M., et al. Mass spectrometric profiling of oxidized lipid products in human nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *J. Lipid Res*. 2010;51(10):3046–3054.
18. Kalhan S. C., Guo L., Edmison J., Dasarathy S., McCullough A. J., Hanson R. W., et al. Plasma metabolomic profile in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism: clinical and experimental*. 2011;60(3):404–413.
19. Shen J., Chan H. L., Wong G. L., Choi P. C., Chan A. W., Chan H. Y., et al. Non-invasive diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis by combined serum biomarkers. *Journal of hepatology*. 2012;56(6):1363–1370.
20. Leite N. C., Salles G. F., Cardoso C. R., Villela-Nogueira C. A. Serum biomarkers in type 2 diabetic patients with non-alcoholic steatohepatitis and advanced fibrosis. *Hepatology research: the official journal of the Japan Society of Hepatology*. 2013;43(5): 508–515.
21. Gorden D. L., Myers D. S., Ivanova P. T., Fahy E., Maurya M. R., Gupta S., et al. Biomarkers of NAFLD progression: a lipidomics approach to an epidemic. *J. Lipid Res*. 2015;56(3):722–736.
22. Loomba R., Quehenberger O., Armando A., Dennis E. A. Polyunsaturated fatty acid metabolites as novel lipidomic biomarkers for noninvasive diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis. *J. Lipid Res*. 2015;56(1):185–192.
23. Yamasaki Y., Nouse K., Miyahara K., Wada N., Dohi C., Morimoto Y., et al. Use of non-invasive serum glycan markers to distinguish non-alcoholic steatohepatitis from simple steatosis. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2015;30(3):528–534.
24. Zhou Y., Oresic M., Leivonen M., Gopalacharyulu P., Hyysalo J., Arola J. et al. Noninvasive detection of nonalcoholic steatohepatitis using clinical markers and circulating levels of lipids and metabolites. *Clin. Gastroenterol Hepatol*. 2016;14(10):1463–1472.
25. Yoo W., Gjuka D., Stevenson H. L., Song X., Shen H., Yoo S. Y., et al. Fatty acids in non-alcoholic steatohepatitis: Focus on pentadecanoic acid. *PLoS ONE*. 2017;12(12): e0189965(5).
26. Puri P., Baillie R. A., Wiest M. M., Mirshahi F., Choudhury J., Cheung O., et al. A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2007;46(4):1081–1090.
27. Yamada K., Mizukoshi E., Sunagozaka H., Arai K., Yamashita T., Takeshita Y., et al. Characteristics of hepatic fatty acid compositions in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Liver international: official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2015;35(2):582–590.
28. Puri P., Wiest M. M., Cheung O., Mirshahi F., Sargeant C., Min H. K., et al. The plasma lipidomic signature of non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2009;50(6):1827–1838.
29. Scorletti E., Byrne C. D. Omega-3 fatty acids, hepatic lipid metabolism, and nonalcoholic fatty liver disease. *Annual review of nutrition*. 2013;(33):231–248.
30. Nobili V., Carpino G., Alisi A., De Vito R., Franchitto A., Alpini G., et al. Role of docosahexaenoic acid treatment in improving liver histology in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *PloS One*. 2014;9(2): e88005(3).
31. Parker H. M., Johnson N. A., Burdon C. A., Cohn J. S., O'Connor H. T., George J. Omega-3 supplementation and non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *Journal of hepatology*. 2012; 56(4): 944–951.
32. Scorletti E., Bhatia L., McCormick K. G., Clough G. F., Nash K., Hodson L., et al. Effects of purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in nonalcoholic fatty liver disease: results from the Welcome* study. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2014; 60(4):1211–1221.
33. Argo C. K., Patrie J. T., Lackner C., Henry T. D., de Lange E. E., Weltman A. L., et al. Effects of n-3 fish oil on metabolic and histological parameters in NASH: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Journal of hepatology*. 2015;62(1): 190–197.
34. Jenkins B., West J. A., Koulman A. A review of odd-chain fatty acid metabolism and the role of pentadecanoic Acid (c15:0) and heptadecanoic Acid (c17:0) in health and disease. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2015;20(2): 2425–2444.
35. Vlaeminck B., Fievez V., Cabrita A. R. J., Fonseca A. J. M., Dewhurst R. J. Factors affecting odd- and branched-chain fatty acids in milk: A review. *Animal Feed Science and Technology*. 2006;(131):389–417.
36. Khaw K. T., Friesen M. D., Riboli E., Luben R., Wareham N. Plasma phospholipid fatty acid concentration and incident coronary heart disease in men and women: the EPIC-Norfolk prospective study. *PLoS medicine*. 2012;9(7): e1001255(5).
37. Meikle P. J., Wong G., Barlow C. K., Weir J. M., Greeve M. A., MacIntosh G. L., et al. Plasma lipid profiling shows similar associations with prediabetes and type 2 diabetes. *PloS One*. 2013; 8(9): e74341(4).
38. Forouhi N. G., Koulman A., Sharp S. J., Imamura F., Kroger J., Schulze M. B., et al. Differences in the prospective association between individual plasma phospholipid saturated fatty acids and incident type 2 diabetes: the EPIC-InterAct case-cohort study. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. 2014;2(10):810–818.
39. Kowdley K. V., Belt P., Wilson L. A., Yeh M. M., Neuschwander-Tetri B. A., Chalasani N., et al. Serum ferritin is an independent predictor of histologic severity and advanced fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2012.; 55(1): 77–85.
40. Verhaegh P., Bavalia R., Winkens B., Masclee A., Jonkers D., Koek G. Non-invasive tests do not accurately differentiate non-alcoholic steatohepatitis from simple steatosis: a systematic review and meta-analysis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol*. 2017. Aug 22.