АМИНОКИСЛОТЫ КАК БИОМАРКЕРЫ ФАЗОВОГО СОСТАВА ХОЛЕЛИТОВ

О. Е. Амосова, Е. В. Машина, С. Н. Шанина

Институт геологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар
kramosova@geo.komisc.ru, borovkova@geo.komisc.ru, shanina@geo.komisc.ru

Желчнокаменная болезнь (холелитиаз) остается одним из самых распространенных гастроэнтерологических заболеваний во всем мире. Процесс образования желчных камней (холелитов) до конца не исследован из-за скрытого протекания начальной стадии желчнокаменной болезни. Состав холелитов многообразен. Среди веществ, присутствующих в составе холелитов, наименее исследована белковая составляющая, структурными единицами которой являются аминокислоты. В связи с чем основной целью исследования являлось выявление закономерностей изменения аминокислотного состава желчных камней различных фазовых составов. Объектами исследования послужили 23 образца холелитов, принадлежащих жителям Республики Коми. Анализ данных проводился статистическими одномерными и многомерными методами. Статистический анализ, примененный в данной работе для изучения патогенных образований в организме человека, позволил выявить качественно новые, не отмеченные ранее особенности аминокислотного состава холелитов, что свидетельствует о различии белковой компоненты и её связи с фазовым составом холелитов.

Согласно результатам кластерного анализа по содержаниям всех аминокислот исследуемые холелиты группируются по трем различным по фазовому составу типам — холестеринovому, холестеринovому с минеральной компонентой, пигментному. Критериями Манна – Уитни и Стьюдента установлено, что все три типа холелитов попарно статистически значимо ($p < 0.05$) различаются по содержанию аланина, валина, изолейцина, лейцина, пролина, фенилаланина, аспарагиновой и глутаминовой кислот. Самые низкие содержания перечисленных аминокислот определены в холестериновых желчных камнях, самые высокие — в пигментных. Многомерным методом *деревья классификации* также выявлены индивидуальные аминокислоты — фенилаланин, пролин, лейцин — по которым холелиты разных фазовых составов четко разделяются по типам. Основываясь на результатах, полученных статистическими методами анализа данных, особое внимание следует обратить на фенилаланин. Эта аминокислота наиболее четко по сравнению с другими различает холелиты разного фазового состава.

Установленные зависимости могут быть использованы для прогнозирования типа холелитиаза, решения проблемы образования желчных камней и метафилактики.

Ключевые слова: критерий Манна – Уитни, непарный критерий Стьюдента, кластерный анализ, *деревья классификации*, холелиты, аминокислоты.

AMINOACIDS AS BIOMARKERS OF PHASE COMPOSITION OF GALLSTONES

O. Ye. Amosova, E. V. Mashina, S. N. Shanina

Institute of Geology FRC Komi SC UB RAS, Syktyvkar, Russia

Gallstone disease (cholelithiasis) remains one of the most common gastroenterological diseases worldwide. The formation of gallstones has not been fully studied due to the latent course of the initial stage of gallstone disease. The composition of gallstones is diverse. Among the substances present in gallstones, the least studied is the protein component, the structural units of which are amino acids. In this connection, the main goal of the study was to identify patterns of changes in the amino acid composition of gallstones of various phase compositions. The objects of the study were 23 samples of gallstones belonging to residents of the Komi Republic. Data analysis was carried out by statistical one-dimensional and multidimensional methods. The statistical analysis, used in this work to study pathogenic formations in the human body, revealed qualitatively new, previously unremarked features of the amino acid composition of gallstones, which indicated the difference in the protein component and its relationship with the phase composition of gallstones.

According to the results of cluster analysis by the contents of all amino acids, the studied gallstones were grouped into three different phase compositions of the type — cholesterol, cholesterol with a mineral component, and pigment. The Mann-Whitney and Student's criteria established that all three types of gallstones were statistically significantly ($p < 0.05$) pairwise different in the contents of alanine, valine, isoleucine, leucine, proline, phenylalanine, aspartic and glutamic acid. The lowest contents of the amino acids were determined in cholesterol gallstones, the highest — in pigment ones. The multidimensional method of classification trees also revealed individual amino acids phenylalanine, proline, leucine, according to which gallstones of different phase compositions were clearly separated by type. Based on the results obtained by statistical methods, special attention should be paid to Phenylalanine acid most clearly compared gallstones of different phase composition in comparison with others.

The established relationships can be used to predict the type of cholelithiasis, to solve the problem of gallstones formation and metaphylaxis.

Keywords: Mann-Whitney test, Student's unpaired t-test, cluster analysis, classification trees, gallstones, amino acids.

Введение

Желчнокаменная болезнь (холелитиаз) является одним из самых распространенных гастроэнтерологических заболеваний во всем мире. Тактика лечения и предотвращения данного заболевания остается наиболее актуальной задачей современной медицины [10].

Процесс образования желчных камней (холелитов) до конца не исследован из-за скрытого протекания начальной стадии желчнокаменной болезни. В целом считается, что холелитиаз — многофакторное и многостадийное заболевание, характеризующееся нарушением в первую очередь обмена холестерина или билирубина с

Для цитирования: Амосова О. Е., Машина Е. В., Шанина С. Н. Аминокислоты как биомаркеры фазового состава холелитов // Вестник геонаук. 2020. № 10(310). С. 22—30. DOI: 10.19110/geov.2020.10.3.

For citation: Amosova O. Ye., Mashina E. V., Shanina S. N. Amino acids as biomarkers of phase composition of gallstones. Vestnik of Geosciences, 2020, 10(310), pp. 22—30. DOI: 10.19110/geov.2020.10.3.

образованием холелитов. К общим факторам развития желчнокаменной болезни относят: экологическое неблагополучие, различные нарушения обмена веществ (дисгормональные, воспалительные заболевания органов системы пищеварения, наследственная склонность и др.), особенности питания, образ жизни человека (гиподинамия, алкоголь, курение, стресс и др.), приём некоторых лекарственных препаратов, возраст. В состав холелитов входят соединения органического и неорганического состава: холестерин, пигмент (билирубин), желчные кислоты, минеральные фазы (карбонат кальция, фосфат кальция), микроэлементы (кальций, железо, медь, магний, цинк, натрий и др.) и белковая компонента. По мнению А. А. Кораго [7], несмотря на присутствие в холелитах различных веществ, в целом их следует разделять на две группы по основным составляющим — холестерину (холестериновые) и билирубину (пигментные). Среди веществ, присутствующих в составе холелитов, наименее исследована белковая компонента, структурными единицами которой являются аминокислоты. Об аминокислотном составе желчных камней известно не так много [8, 15]. Какую роль играют белки в формировании холелитов — вопрос до конца не изученный. Обнаружение белков в холелитах не даёт точного ответа, являются ли они причиной образования желчных камней или выполняют второстепенную роль. На сегодняшний день мало данных о том, какие белки участвуют в формировании холелитов разного состава.

В составе пигментных камней установлены белки с высоким содержанием кислых аминокислот (аспарагиновой и глутаминовой) — это альбумин [23], остеопонтин [18] и низкомолекулярные белки [19].

В образовании холестериновых холелитов участвуют муцины MUC3 и MUC5B [25], гликопротеины с разными молекулярными массами [21], аполипептиды [16]. Основную массу белков этих соединений составляют серин, треонин, пролин, лейцин и аланин. Есть данные [3], что в холестериновых холелитах могут присутствовать продукты неполной диссоциации белков в виде димеров, тримеров и олигомеров аминокислот.

Цель исследования — выявление закономерностей изменения аминокислотного состава при формировании холелитов различных фазовых составов методами статистического анализа для решения вопросов прогнозирования типа холелитиаза и метафилактики, определяющих специфику лечения. В задачи исследования входило установление по аминокислотному составу схожести холелитов одного фазового состава и различий холелитов разных фазовых составов, выявление индивидуальных аминокислот, показывающих статистически значимые отличия холелитов разных фазовых составов.

Объекты и методы исследования

Объектами исследования послужили 23 образца холелитов, принадлежащих жителям Республики Коми, холестеринового и пигментного типов, выделенных в соответствии с классификацией Кораго [7]. Для них были определены содержания 12 аминокислот: аланина (Ala), валина (Val), глицина (Gly), изолейцина (Ile), лейцина (Leu), лизина (Lys), аспарагиновой кислоты (Asp),

глутаминовой кислоты (Glu), серина (Ser), фенилаланина (Phe), тирозина (Tyr), пролина (Pro). Идентификация и определение содержания аминокислот в образцах выполнены на газовом хроматографе GC-17A (Shimadzu, капиллярная колонка Chirasil-L-Val). Для извлечения аминокислот из образцов применяли кислотный гидролиз в 6М HCl при t 105 °C в течение 12 часов. Выделенные из гидролизата аминокислоты очищали от примесей и переводили в N-пентафторпропионовые изопропиловые эфиры соответствующих аминокислот. Методика определения аминокислотного состава подробно описана в работе [14].

Для выявления взаимосвязи фазового состава холелитов (холестерин, билирубин, фосфат кальция, карбонат кальция) с аминокислотным составом нами были привлечены статистические методы исследования с использованием программного продукта Statistica 6.0. Выявление групп холелитов, схожих по аминокислотному составу, проводилось иерархическим агломеративным кластерным анализом (мера расстояния между кластерами — евклидово расстояние, правило связи кластеров — метод полной связи) [13]. Для установления индивидуальных аминокислот, по содержанию которых холелиты разных типов различаются статистически значимо, использовались непараметрический критерий Манна — Уитни и параметрический непарный критерий Стьюдента. Многомерный метод *деревья классификации* был применен для выявления наиболее информативных аминокислот и построения по ним моделей классификации образцов холелитов. Статистическая оценка проводилась для заданного критического уровня значимости 0.05.

Ранее подобные исследования были проведены нами для выявления и подтверждения существования взаимосвязи аминокислотного состава патогенных биоминералов — уролитов (мочевых камней) — с их минеральной составляющей [1, 6].

Результаты исследований

Кластерный анализ

По результатам кластерного анализа холелиты по содержанию аминокислот группируются в два сильно различающихся кластера — холестериновых и пигментных холелитов (рис. 1). Оказалось, что кластер холестериновых холелитов, в свою очередь, состоит из двух кластеров. Анализ образцов каждого из этих кластеров показал, что один содержит холелиты холестеринового состава, второй — холелиты, состоящие из холестерина и минеральной компоненты (карбонат кальция, фосфат кальция). Таким образом, на основании результатов кластерного анализа холестериновый тип можно разделить на два подтипа — холестериновый и холестериновый с минеральной составляющей. Поэтому далее в статье будем рассматривать три типа холелитов — холестериновый, холестериновый с минеральной компонентой и пигментный. Заметим, каждый кластер содержит образцы холелитов только одного типа. Это показывает, что холелиты одного фазового состава схожи между собой по составу аминокислот. Как видно на рис. 1, по составу аминокислот наиболее неоднородны пигментные холелиты. Содержания аминокислот в холелитах разных типов приведены в табл. 1.

Рис. 1. Дендрограмма кластеров холелитов, схожих по аминокислотному составу, полученная иерархическим агломеративным кластерным анализом (мера расстояния между кластерами — евклидово расстояние, правило связи кластеров — метод полной связи). На оси ординат — образцы холелитов трех типов: 1–8 — холестеринового, 9–16 — холестеринового с минеральной компонентой, 17–23 — пигментного. По оси абсцисс — расстояния объединения кластеров, представленные в масштабированном в процентах виде: (расстояние связи / максимальное расстояние) * 100 %

Fig. 1. A dendrogram of clusters gallstones similar amino acid composition, obtained using hierarchical agglomerative cluster analysis (measure the distance between clusters is the Euclidean distance, the connecting rule of clusters is the method of complete linkage). Designation. On the y-axis marked samples gallstones: 1–8 — cholesterol type, 9–16 — cholesterol with mineral component type, 17–23 — pigment type. On the x-axis is the distance of the joining of clusters presented in a scaled in percent form: (connection distance / maximum distance) * 100 %

Нормальный закон распределения

Проведение проверки нормальности законов распределения содержания аминокислот холелитов каждого типа обусловлено выбором статистических критериев и методов (параметрических или непараметрических) для дальнейшего корректного анализа данных. Для этого были использованы критерии Шапиро — Уилка (статистика W), Колмогорова — Смирнова с поправкой Лиллиефорса (статистика d), оценки значений коэффициентов асимметрии A и эксцесса E (абсолютные значения обоих не превышают единицы), визуальный анализ нормальных вероятностных графиков. По результатам проведенной проверки близкие к нормальному распределению имеют не более пяти аминокислот для каждого типа. Для холестеринотипов холелитов это Val ($W = 0.949$; $p = 0.699$; $d = 0.180$; $p > 0.20$; $A = -0.35$; $E = -0.19$), Glu ($W = 0.961$; $p = 0.816$; $d = 0.159$; $p > 0.20$; $A = 0.53$; $E = -0.29$), для холестеринотипов с минеральной компонентой это Ile ($W = 0.962$; $p = 0.833$; $d = 0.140$; $p > 0.20$; $A = -0.54$; $E = 0.14$), Tyr ($W = 0.883$; $p = 0.203$; $d = 0.234$; $p < 0.20$; $A = 0.63$; $E = -0.64$), для пигментных это Val ($W = 0.959$; $p = 0.814$; $d = 0.135$; $p > 0.20$; $A = -0.68$; $E = -0.16$), Gly ($W = 0.916$; $p = 0.438$; $d = 0.189$; $p > 0.20$; $A = 0.69$; $E = -0.64$), Ser ($W = 0.951$; $p = 0.741$; $d = 0.196$; $p > 0.20$; $A = -0.22$; $E = 0.24$), Leu ($W = 0.952$; $p = 0.746$; $d = 0.158$; $p > 0.20$; $A = 0.34$; $E = -0.68$), Glu ($W = 0.965$; $p = 0.863$; $d = 0.162$; $p > 0.20$; $A = -0.08$; $E = -0.75$). Отметим, что ни одна из аминокислот не подчиняется закону нормального распределения для всех трёх типов холелитов одновременно. Только

содержания Val и Glu имеют распределения, близкие к нормальному, для холестеринотипов и пигментного типа холелитов. Поэтому для выявления различий содержания Val и Glu в образцах этих двух типов можно использовать непарный критерий Стьюдента (параметрический статистический метод сравнения двух независимых групп объектов по одному признаку). Для парного сравнения холелитов разных типов по содержанию остальных аминокислот использовался непараметрический критерий Манна — Уитни.

Критерии Манна — Уитни и Стьюдента

При попарном сравнении всех трёх типов холелитов использовался скорректированный критический уровень значимости 0.017, вычисленный по заданному критическому уровню значимости 0.05. Корректировка критического уровня значимости при попарном сравнении нескольких типов связана с проблемой множественных сравнений [9]. Установлено, что все три типа холелитов статистически значимо ($p < 0.05$) различаются по содержаниям аминокислот Ala, Val, Ile, Leu, Pro, Phe, Asp и Glu. Результаты расчетов критериев Манна — Уитни и Стьюдента приведены в табл. 2 и 3. Причем по Val и Glu оба критерия (Манна — Уитни, непарный Стьюдента) показали наличие статистически значимых различий. По содержанию Gly холелиты холестеринотипов с минеральной компонентой и пигментного типа статистически значимо ($p < 0.017$) отличаются от холестеринотипов, но не различаются между собой (табл. 2). Холестеринотиповые холелиты характеризуются низкими содержаниями Gly по сравнению с холесте-

Таблица 1. Описательные статистики содержаний аминокислот (мг/г) в желчных камнях

Table 1. Descriptive statistics of amino acid contents in gallstones

Аминокислота Amino acid	Тип холелита / Type of cholelite					
	Холестериновый Cholesterol		Холестериновый с минеральной компонентой Cholesterol with mineral component		Пигментный Pigment	
	Me		Me		Me	
	Min	Max	Min	Max	Min	Max
Ala	0.136		0.461		1.526	
	0.081	0.346	0.301	0.706	1.217	2.423
Val	0.077		0.403		1.116	
	0.0	0.136	0.204	0.541	0.460	1.470
Gly	0.695		1.757		7.528	
	0.361	1.149	0.979	4.164	1.216	21.974
Ile	0.033		0.144		0.706	
	0.0	0.058	0.0	0.236	0.264	0.860
Ser	0.336		0.438		1.119	
	0.075	0.470	0.240	0.562	0.397	1.817
Leu	0.124		0.736		1.893	
	0.058	0.237	0.315	0.939	1.455	2.315
Pro	0.068		0.326		0.949	
	0.0	0.135	0.249	0.619	0.476	1.319
Asp	0.104		0.471		1.716	
	0.0	0.240	0.326	0.971	1.273	4.286
Glu	0.163		0.564		2.373	
	0.035	0.358	0.228	1.314	1.475	3.205
Phe	0.096		0.302		1.013	
	0.024	0.141	0.255	0.454	0.879	1.329
Tyr	0.0		0.094		1.029	
	0.0	0.089	0.0	0.254	0.182	1.551
Lys	0.073		0.110		0.848	
	0.0	0.116	0.031	0.579	0.051	1.238

Примечание: Me — медианное среднее значение, Min, Max — минимальное и максимальные значения.

Note: Me — median average value; Min, Max — minimum and maximum values.

риновыми с минеральной компонентой и пигментными (табл. 1). По содержаниям Ser, Tyr, Lys холелиты холестеринного и холестеринного с минеральной компонентой типов статистически значимо отличаются от пигментных, но не различаются между собой (табл. 2). Пигментные холелиты имеют более высокие содержания Ser, Tyr и Lys, чем холестеринные с минеральной компонентой и холестеринные (табл. 1).

Деревья классификации

Многомерный метод *деревья классификации* [4, 17] использовался нами для выявления индивидуальных аминокислот, по содержаниям которых холелиты разных фазовых составов наиболее сильно различаются между собой, и для построения моделей классификации образцов холелитов по аминокислотному составу. Графы деревьев классификации наглядно демонстрируют различия холелитов разных типов и позволяют предсказывать принадлежность холелитов к определенному, заранее известному типу в зависимости от соответствующих значений содержаний аминокислот. Существует и другой метод классификации — дискриминантный анализ [13], но для его правомерного применения необходимо выполнение некоторых условий: многомерной нормальности распределения содержа-

ний аминокислот для каждого типа холелитов, равенства матриц ковариаций. В связи с невыполнением исходных требований для построения моделей классификации использовался метод *деревья классификации*. Он показал 100 % правильную автоклассификацию всех 23 образцов холелитов для всех типов ветвления, реализованных в программе Statistica 6.0 (дискриминантное одномерное ветвление для категориальных и порядковых предикторов, полный перебор для одномерных ветвлений по методу C&RT, дискриминантное ветвление по линейным комбинациям порядковых предикторов), всех имеющихся условий прекращения ветвлений — прямая остановка, по ошибке классификации, по отклонению — и для заданных априорных вероятностей (0.42 — холестеринные, 0.48 — холестеринные с минеральной компонентой, 0.1 — пигментные). В имеющейся в распоряжении авторов коллекции желчных камней (100 образцов, по одному от человека), полученных от жителей Республики Коми, относительные частоты встречаемости холелитов разных типов неодинаковы. Так, доля холестеринных холелитов составляет 42 %, холестеринных с минеральной составляющей — 48 % и пигментных — 10 %. Поэтому значения априорных вероятностей заданы с учетом исходных частот встречаемости разных типов холелитов.

Таблица 2. Результаты расчёта критерия Манна – Уитни

Table 2. Results of Mann – Whitney test calculation

Аминокислота Amino acid	Сравниваемые типы холелитов / Compared types of cholelites								
	Холестериновые (n ₁ =8) и холестеринные с минеральной компонентой (n ₂ =8) Cholesterol (n ₁ =8) and cholesterol with mineral component (n ₂ =8)			Холестериновые (n ₁ =8) и пигментные (n ₂ =7) Cholesterol (n ₁ =8) and pigment (n ₂ =7)			Холестериновые с минеральной компонентой (n ₁ =8) и пигментные (n ₂ =7) Cholesterol with mineral component (n ₁ =8) and pigment (n ₂ =7)		
	U	Z	p	U	Z	p	U	Z	p
Ala	2.0	-3.151	0.002	0.0	-3.240	0.001	0.0	-3.240	0.001
Val	0.0	-3.361	0.001	0.0	-3.240	0.001	3.0	-2.893	0.004
Gly	4.0	-2.941	0.003	0.0	-3.240	0.001	13.0	-1.736	0.083
Ile	6.5	-2.678	0.007	0.0	-3.240	0.001	0.0	-3.240	0.001
Ser	15.0	-1.785	0.074	1.0	-3.125	0.002	5.0	-2.662	0.008
Leu	0.0	-3.361	0.001	0.0	-3.240	0.001	0.0	-3.240	0.001
Pro	0.0	-3.361	0.001	0.0	-3.240	0.001	2.0	-3.009	0.003
Asp	0.0	-3.361	0.001	0.0	-3.240	0.001	0.0	-3.240	0.001
Glu	2.0	-3.151	0.002	0.0	-3.240	0.001	0.0	-3.240	0.001
Phe	0.0	-3.361	0.001	0.0	-3.240	0.001	0.0	-3.240	0.001
Tyr	12.0	-2.100	0.036	0.0	-3.240	0.001	3.0	-2.893	0.004
Lys	18.0	-1.470	0.142	5.0	-2.662	0.008	6.0	-2.546	0.011

Примечание: n₁, n₂ — количества образцов холелитов соответствующего типа, U — значение критерия Манна – Уитни, p — достигнутый уровень значимости.

Note: n₁, n₂ — numbers of each type of gallstones; U — the value of the Mann – Whitney test; p — achieved level of significance.

Таблица 3. Результаты расчётов непарного критерия Стьюдента проверки гипотезы равенства средних и критерия Левена проверки гипотезы равенства дисперсий содержаний аминокислот Val, Glu для холестеринного (8 образцов) и пигментного (7 образцов) типов холелитов

Table 3. Results of calculations of unpaired Student's t-test for test of means equality hypothesis and Levene's test for test of equality of variance hypothesis for contents of Val, Glu amino acids in gallstones of cholesterol (8 samples) and pigment (7 samples) types

Аминокислота Amino acid	$\bar{X}_1$	$\bar{X}_2$	s ₁	s ₂	Левена F(1,df) Leven F(1,df)	df	p Левена p Leven	t	df	p двуст.
Val	0.077	1.059	0.045	0.353	13.340	13	0.003	-7.317	6.17	2.9E-04
Glu	0.182	2.340	0.105	0.610	7.997	13	0.014	-9.245	6.31	6.7E-05

Примечание: $\bar{X}_1$ — среднее содержание аминокислоты в холелитах холестеринного типа, $\bar{X}_2$ — среднее содержание аминокислоты в холелитах пигментного типа, s₁ — стандартное отклонение для холестеринного типа, s₂ — стандартное отклонение для пигментного типа, F — значение критерия Левена, t — значение критерия Стьюдента с разделёнными оценками дисперсий, df — число степеней свободы, p — достигнутый уровень значимости.

Note: $\bar{X}_1$ — average amino acid content in the gallstones cholesterol type, $\bar{X}_2$ — the average amino acid content in the gallstones pigment type, s₁ — the standard deviation for cholesterol type, s₂ — the standard deviation for pigment type, F — the value of Levene's test, t — the value of Student's t-test with separate estimates of variances, df — the number of degrees of freedom, p — achieved level of significance.

Все деревья классификации, полученные тремя типами ветвления, дают быстрые (короткие) решения — 2 ветвления, 3 терминальные вершины — и верно классифицируют все образцы: каждая из терминальных вершин не содержит неправильно классифицированных образцов (рис. 2, 4).

Так, для дерева классификации, полученного дискриминантным одномерным ветвлением для категориальных и порядковых предикторов, классификация образцов происходит с помощью двух ветвлений по содержанию фенилаланина (рис. 2). Сначала первым ветвлением отделяются все пигментные холелиты от остальных, вторым ветвлением разделяются холестеринные и холестеринные с минеральной компонентой холелиты. Таким образом, холелиты разных типов

хорошо различаются по содержанию одной аминокислоты — Phe. Диапазоны варьирования содержаний Phe в холелитах трёх типов не пересекаются (табл. 1, рис. 3). Установлено, что наибольшие концентрации фенилаланина характерны для пигментных холелитов, а наименьшие — для холелитов холестеринного типа. То же самое наблюдается для Leu, Asp. Таким образом, образцы холелитов можно классифицировать по содержанию Phe, а аминокислоты Leu и Asp использовать как вспомогательные индикаторы классификации. Визуальный анализ варьирования содержаний этих трёх аминокислот во всех исследуемых типах холелитов (табл. 1) показал, что именно для Phe характерны наименьшие степени разбросанности (рассеивания) содержания для каждого исследуемого типа холелитов по сравнению с Leu, Asp.

Рис. 2. Граф дерева классификации образцов желчных камней, полученный по составу 12 аминокислот (тип ветвления — дискриминантное одномерное ветвление для категориальных и порядковых предикторов, априорные вероятности: 0.42 — холестерин, 0.48 — холестерин с минеральной компонентой, 0.1 — пигментный). Обозначения: 1 — холестерин, 2 — холестерин с минеральной компонентой, 3 — пигментный тип

Fig. 2. The graph of classification tree of gallstones on composition of 12 amino acids (split selection method — Discriminant-based univariate split for categorical and ordered predictors, a priori probabilities: 0.42 — cholesterol type, 0.48 — cholesterol with mineral component type, 0.1 — pigment type). Designation: 1 — cholesterol type, 2 — cholesterol with mineral component type, 3 — pigment type

Рис. 3. Изменение содержаний Phe в холелитах трёх типов

Fig. 3. Change of Phe contents in gallstones three types

Для дерева классификации, полученного полным перебором для одномерных ветвлений по методу C&RT (рис. 4), ветвления осуществляются по Pro, Leu. Первым ветвлением по содержанию Pro отделяются все холестериновые холелиты от остальных. Вторым ветвлением по содержанию Leu отделяются холелиты холестеринного с минеральной компонентой типа от пигментных.

Оценка полученных моделей деревьев классификации и их способности к прогнозированию была проведена глобальной кросс-проверкой [4, 17]. Наилучшие результаты были достигнуты для деревьев классификации (рис. 2 и 4), полученных дискриминантным одномерным ветвлением для категориальных и порядковых предикторов (правило остановки — прямая остановка FACT) и полным перебором для одномерных ветвлений по методу C&RT (правила остановки — по отклонению и прямая остановка FACT): средняя доля ошибочно классифицированных образцов — 0 %. Для деревьев классификации, построенных по линейным комбинациям предикторов (содержаниям 12 аминокислот) для всех перечисленных выше правил остановки, глобаль-

ная кросс-проверка показала наличие ошибок классификации: средняя доля ошибочно классифицированных образцов — более 60 %.

Обсуждение результатов

На основании статистических исследований установлено, что все изученные типы холелитов статистически значимо различаются по содержаниям аланина, изолейцина, лейцина, пролина, валина, фенилаланина, глутаминовой и аспарагиновой кислот (табл. 2). Самые низкие содержания перечисленных аминокислот определены в холестериновых желчных камнях, самые высокие — в пигментных, что указывает на разные условия образования холелитов различного фазового состава.

Согласно результатам статистического анализа особое внимание следует обратить на аминокислоту Phe. Она наиболее чётко по сравнению с другими отмеченными аминокислотами различает холелиты разного фазового состава, и эти различия статистически значимы. Фенилаланин относится к незаменимым аминокис-

Рис. 4. Граф дерева классификации образцов желчных камней, полученный по составу 12 аминокислот (тип ветвления — полный перебор для одномерных ветвлений по методу C&RT, априорные вероятности: 0.42 — холестериновые, 0.48 — холестериновые с минеральной компонентой, 0.1 — пигментные). Обозначения см. на рис. 2

Fig. 4. The graph of classification tree of gallstones on composition of 12 amino acids (split selection method — C&RT-style exhaustive search for univariate splits, a priori probabilities: 0.42 — cholesterol type, 0.48 — cholesterol with mineral component type, 0.1 — pigment type). See fig. 2 for symbols

кислотам, поскольку ткани организма человека не обладают способностью синтеза его бензольного кольца. Поступая в организм из разных источников пищи, он используется в первую очередь для синтеза различных белков; оставшийся неиспользованный запас аминокислоты под действием фермента монооксигеназы — фенилаланингидроксилазы — превращается в тирозин [11]. Фенилаланин в значительных количествах входит в состав молекул белков системы крови, таких как инсулин, альбумин, гемоглобин, фибрин. Основными патологическими факторами, влияющими на повышение концентрации свободного фенилаланина в крови, являются катаболизм (распад) белков и нарушения функции печени [20, 22]. Есть мнение [2], что пигментные желчные камни образуются на фоне глубоких изменений в работе печени, с чем, вероятно, и связаны высокие содержания фенилаланина в пигментных холелитах.

В результате исследования было установлено, что в холестериновых образцах с минеральной составляющей содержания аминокислот выше, чем в холестериновых камнях без минеральной компоненты (табл. 1). Повышение содержания белковой компоненты происходит за счет увеличения содержаний отдельных аминокислот: аланина, валина, глицина, изолейцина, лейцина, пролина, тирозина, фенилаланина, аспарагиновой и глутаминовой кислот. Вероятно, данные аминокислоты имеют связь с минеральной составляющей. Многие белки, в состав которых входят перечисленные аминокислоты, способствуют образованию карбонатных и фосфатных минералов, как в природных условиях, так и в экспериментальных. Например, в природных условиях образование раковин моллюсков, состоящих из карбоната кальция, не происходит без участия белка конхиолина, характеризующегося большим содержанием кислых аминокислот [5]. Экспериментально выяснено, что в присутствии альбумина образуется карбонатный минерал — ватерит [12, 24]. Тем самым можно

полагать, что определенные белки способствуют процессу образования минеральных фаз.

По нашим данным, содержание глицина в холестериновых холелитах статистически значимо ниже, чем в холелитах холестеринового с минеральной компонентой и пигментного типов (табл. 1, 2). В холелитах этих двух типов содержания глицина не различаются статистически значимо. Глицин — простейшая аминокислота — является составляющей не только белков, но и гликохолевой кислоты (продукт конъюгации холевой кислоты и глицина), присутствующей в желчи. Таким образом, повышенные содержания глицина в пигментных и холестериновых с минеральной компонентой холелитах в отличие от холестериновых, по-видимому, обусловлены не только вхождением его в белки, но и связаны с присутствием гликохолевой кислоты.

Таким образом, каждый тип холелитов характеризуется своими особенностями аминокислотного, а следовательно и белкового состава, что указывает на различие биохимических процессов, протекающих при формировании холелитов.

Как упоминалось выше, в холелитах могут присутствовать самые различные белковые вещества системы крови, гепатобилиарной системы, а также специфичные белки. На данный момент точно не установлено, какие белки участвуют в формировании холелитов разного состава, в связи с чем исследование их аминокислотного состава является важным аспектом, дающим информацию о возможном составе белковых веществ, принимающих участие в образовании холелитов.

Следует отметить, что установление белкового состава патогенных биоминералов требует существенных и трудоемких исследований, тогда как аминокислотный анализ проще в пробоподготовке и расшифровке результатов, но является не менее информативным и более доступным исследователю.

Выводы

Статистический анализ, примененный в данной работе для изучения патогенных образований в организме человека, позволил получить новые результаты, которые могут быть использованы для решения проблемы образования желчных камней, представляющей серьезную опасность для здоровья человека.

Результаты проведенного исследования особенностей аминокислотного состава холелитов разного фазового состава подтвердили различие биохимических процессов, происходящих при холелитиазе. Применение статистических методов позволило выявить прежде не отмеченные закономерности в формировании холелитов. Выявленные отличия в аминокислотном составе свидетельствуют о специфике белковой компоненты, характерной для каждого типа холелитов. Статистическими критериями установлено, что холелиты разного фазового состава значимо ($p < 0.05$) различаются по содержаниям Ala, Val, Ile, Leu, Pro, Phe, Asp и Glu. Самые низкие содержания перечисленных аминокислот определены в холестериновых желчных камнях, самые высокие — в пигментных. Особое внимание следует обратить на аминокислоту фенилаланин. Она наиболее четко по сравнению с другими отмеченными аминокислотами различает холелиты разного фазового состава на основании результатов, полученных одномерными и многомерными статистическими методами анализа данных. Установленные зависимости могут быть использованы для решения вопросов прогнозирования типа холелитиаза и метафилактики.

Определение аминокислотного состава выполнено на аналитическом оборудовании ЦКП «Геонаука» в ИГ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН.

Литература

- Амосова О. Е., Шанина С. Н., Каткова В. И. Статистический анализ аминокислотного состава уrolитов жителей республики Коми // Известия Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук. 2019. № 4. С. 37–44. DOI: 10.19110/1994-5655-2019-4-37-44.
- Вагнер Е. А., Палатова Л. Ф., Котельникова Л. П. Взаимосвязь изменений ткани печени, химического состава желчи и желчных камней // Вестник хирургии. 1987. № 12. С. 24–27.
- Вахрушев Я. М., Горбунов А. Ю. Содержание микроэлементов желчи в желчных камнях при холелитиазе // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2009. № 3. С. 64–68.
- Деревья классификации. URL: http://www.statlab.kubsu.ru/sites/project_bank/trees.pdf (дата обращения: 29.03.2018).
- Дроздова Т. В. Геохимия аминокислот. М.: Наука, 1977. 199 с.
- Каткова В. И., Амосова О. Е., Шанина С. Н. Скрытые биомаркеры процессов минералообразования в генезисе уrolитов // Вестник Кольского научного центра Российской академии наук. 2018. № 4. С. 17–24. DOI: 10.25702/KSC.2307-5228-4-2018-10.
- Кораго А. А. Введение в биоминералогию. СПб.: Недра, 1992. 280 с.
- Машина Е. В., Шанина С. Н. Аминокислотный состав холелитов и его связь с минеральной компонентой // Записки Российского минералогического общества. 2019. № 4. С. 95–109. DOI: 10.30695/zrmo/2019.1484.07
- Проблема множественных сравнений при проверках статистических теорий. URL: <https://lit-review.ru/biostatistika/mnozhestvennye-sravneniya/> (дата обращения: 20.06.2019).
- Селезнева Э. Я., Быстровская Е. В., Орлова Ю. Н., Коричева Е. С., Мечетина Т. А. Алгоритм диагностики и лечения желчнокаменной болезни // Русский медицинский журнал. 2015. №13. С. 730–737.
- Сыровая А. О., Шаповал Л. Г., Макаров В. А., Петюнина В. Н., Грабовецкая Е. Р., Андреева С. В., Наконечная С. А., Бачинский Р. О., Лукьянова Л. В., Козуб С. Н., Левашова О. Л. Аминокислоты глазами химиков, фармацевтов, биологов. Харьков: Щедра садиба плюс, 2015. Т. 2. 268 с.
- Трушина Д. Б. Структура и свойства частиц ватерита с регулируемым размером и их применение в качестве основы носителей для доставки лекарственных веществ: Дис... канд. физ. наук. М., 2016. 131 с.
- Факторный, дискриминантный и кластерный анализ: Пер. с англ. / Дж.-О. Ким, Ч. У. Мьюллер, У. Р. Клекка, М. С. Олдендерфер, Р. К. Блэшфилд; Под ред. И. С. Енюкова. М.: Финансы и статистика, 1989. 215 с.
- Amelung W., Zhang X. Determination of amino acid enantiomers in soils // Soil biology and biochemistry. 2001. Vol. 33. P. 553–562.
- Chen Y., Wang L., Yu Y. Analysis of amino acid constituents of gallstones // World Journal Gastroenterology. 1997. Vol. 3, № 4. P. 255–256.
- Hasegawa T., Makino I. Measurement of apolipoprotein A1 in cholesterol gallstones and gallbladder bile of patients with gallstones // Journal Gastroenterology. 1995. Vol. 30, № 1. P. 96–102.
- How to predict Membership, Classification trees. URL: <http://www.statsoft.com/Textbook/Classification-Trees> (accessed: 05.03.2018).
- Imano M., Satou T., Itoh T., Takeyama Y., Yasuda A., Peng YF. An immunohistochemical study of osteopontin in pigment gallstone formation // The American Surgeon. 2010. Vol. 76, № 1. P. 91–95.
- Kestell M. F., Sekijima J., Lee S.P., Park H.Z., Long M., Kaler E.W. A calcium-binding protein in bile and gallstones // Hepatology. 1992. Vol. 16, № 6. P. 1315–1321.
- Kinny-Kuster B., Bartels M., Becker S., Scholz M., Thierry J., Ceglarek U., Kaiser T. Plasma Amino Acid Concentrations Predict Mortality in Patients with End-Stage Liver Disease // PLoS One. 2016. Vol. 11, № 7. P. 1–13.
- Lipsett P. A., Hildreth J., Kaufman H. S., Lillemoe K. D., Pitt H. A. Human gallstones contain pronucleating nonmucin glycoproteins that are immunoglobulins // Annals of Surgery. 1994. Vol. 219, № 1. P. 25–33.
- Morgan M., Marshall A., Milsom J., Sherlock S. Plasma amino-acid patterns in liver disease // Gut. 1982. Vol. 23, № 5. P. 362–370.
- Tandon R. K., Srivastava A. K., Gupta U. Interrelation of biliary infection and proteins to gallstone proteins in man // Indian Journal of Medical Research. 1980. Vol. 72. P. 398–402.
- Wen-kun Z., Xue-gang L., Chi Z., Tao D., Jian Z. Regulation of microstructure of calcium carbonate crystals by egg white protein // Chemical Research Chinese Universities. 2012. Vol. 28, № 2. P. 180–185.
- Yoo K. S., Choi H. S., Jun D. W., Lee H. L., Lee O. Y., Yoon B. C., Lee K. G., Paik S.S., Kim Y. S., Lee J. MUC expression in gallbladder epithelial tissues in cholesterol-associated gallbladder disease // Gut and Liver. 2016. Vol. 10, № 5. P. 851–858.

References

1. Amosova O. E., Shanina S. N., Katkova V. I. *Statisticheskij analiz aminokislotojnogo sostava urolitov zhitelej respubliky Komi* (The statistical analysis of amino acid composition of urinary stones from inhabitants of the Komi Republic). Proceedings of the Komi science center UB RAS, 2019, No. 4, pp. 37–44. DOI: 10.19110/1994-5655-2019-4-37-44.
2. Wagner E. A., Palatova L. F., Kotelnikova L. P. *Vzaimosvyaz izmenenij tkani pecheni, himicheskogo sostava zhelchi i zhelchnyh kamnej* (The relationship of changes in liver tissue, the chemical composition of bile and gallstones). *Vestnik hirurgii* [Herald of Surgery], 1987, No. 12, pp. 24–27.
3. Vakhrushev Y. M., Gorbunov A. Yu. *Soderzhanie mikroelementov zhelchi v zhelchnyh kamnyah pri holelitiaze* (The content of trace elements of bile in gallstones with cholelithiasis). *Ekspierimentalnaya i klinicheskaya gastroenterologiya* (Experimental and clinical gastroenterology), 2009, No. 3, pp. 64–68.
4. *Derevja klassifikacii* [Classification trees]. In Rus. URL: http://www.statlab.kubsu.ru/sites/project_bank/trees.pdf (accessed: 29.03.2018).
5. Drozdova T.V. *Geohimiya aminokislot* (Amino Acid Geochemistry). Moscow: Science, 1977, 199 p.
6. Katkova V. I., Amosova O. Ye., Shanina S. N. *Skrytye biomarkery protsessov mineraloobrazovaniya v genezise urolitov* (Latent biomarkers of mineral-forming processes in the urolith genesis). *Vestnik of the Kola Scientific Center of the Russian Academy of Sciences. Apatity: GI*, 2018, No. 4, pp. 17–24. DOI: 10.25702/KSC.2307-5228-4-2018-10.
7. Korago A. A. *Vvedenie v biomineralogiu* (Introduction to biomineralogy). St. Petersburg: Nedra, 1992, 280 p.
8. Mashina E. V., Shanina S. N. *Aminokislotojnyj sostav holelitov i ego svyaz' s mineral'noj komponentoj* (Amino acid composition of choleliths and its relationship with the mineral component). *Zapiski Rossijskogo mineralogicheskogo obshchestva* (Notes of the Russian Mineralogical Society), 2019, No. 4, pp. 95–109. DOI: 10.30695/zrmo/2019.1484.07
9. *Problema mnozhestvennyh sravnenij pri proverkah statisticheskijh teorij* (The problem of multiple comparisons in testing statistical theories). URL: <https://lit-review.ru/biostatistika/mnozhestvennye-sravneniya/> (accessed: 20.06.2019).
10. Selezneva E.Ya., Bystrovskaya E.V., Orlova Yu.N., Koricheva E.S., Mechetina T.A. *Algoritm diagnostiki i lecheniya zhelchnokamennoj bolezni* (Algorithm for the diagnosis and treatment of gallstone disease). *Russkij medicinskij zhurnal* (Russian medical journal), 2015, No. 13, pp. 730–737.
11. Syrovaya A. O., Shapoval L. G., Makarov V. A., Petyunina V. N., Grabovetskaya E. R., Andreeva S. V., Nakonechnaya S. A., Bachinsky R. O., Lukyanova L. V., Kozub S. N., Levashova O. L. *Aminokisloty glazami himikov, farmacevtov, biologov* (Amino acids through the eyes of chemists, pharmacists, biologists). X.: Generosity of the Sadiba Plus, 2015, V. 2, 268 p.
12. Trushina D. B. *Struktura i svoystva chastic vaterita s reguliruemym razmerom i ih primenenie v kachestve osnovy nositelej dlya dostavki lekarstvennyh veshchestv: dis...kand. fiz. nauk* (The structure and properties of vaterite particles with an adjustable size and their use as the basis of carriers for drug delivery: disc. cand. physical sciences). Moscow, 2016, 131 p.
13. *Faktornyj, diskriminantnyj i klasternyj analiz* (Factorial, discriminant and cluster analysis), translation from English. Kim J.-O., Muller Ch.U., Klekka U.R., Oldenderfer M. S., Bleshfild R.K.; ed. I.S. Enukov. Moscow: *Finansy i statistika* Publ., 1989, 215 p.
14. Amelung W., Zhang X. Determination of amino acid enantiomers in soils. *Soil biology and biochemistry*, 2001, V. 33, pp. 553–562.
15. Chen Y., Wang L., Yu Y. Analysis of amino acid constituents of gallstones. *World Journal Gastroenterology*, 1997, V. 3, No. 4, pp. 255–256.
16. Hasegawa T., Makino I. Measurement of apolipoprotein A1 in cholesterol gallstones and gallbladder bile of patients with gallstones. *Journal Gastroenterology*, 1995, V. 30, No. 1, pp. 96–102.
17. How to predict Membership, Classification trees. URL: <http://www.statsoft.com/Textbook/Classification-Trees> (accessed: 05.03.2018).
18. Imano M., Satou T., Itoh T., Takeyama Y., Yasuda A., Peng YF. An immunohistochemical study of osteopontin in pigment gallstone formation. *The American Surgeon*, 2010, V. 76, No. 1, pp. 91–95.
19. Kestell M. F., Sekijima J., Lee S. P., Park H. Z., Long M., Kaler E.W. A calcium-binding protein in bile and gallstones. *Hepatology*, 1992, V. 16, No. 6, pp. 1315–1321.
20. Kinny-Kuster B., Bartels M., Becker S., Scholz M., Thiery J., Ceglarek U., Kaiser T. Plasma Amino Acid Concentrations Predict Mortality in Patients with End-Stage Liver Disease. *PLoS One*, 2016, V. 11, No. 7, pp. 1–13.
21. Lipsett P. A., Hildreth J., Kaufman H. S., Lillemoe K. D., Pitt H. A. Human gallstones contain pronucleating nonmucin glycoproteins that are immunoglobulins. *Annals of Surgery*, 1994, V. 219, No. 1, pp. 25–33.
22. Morgan M., Marshall A., Milsom J., Sherlock S. Plasma amino-acid patterns in liver disease. *Gut*, 1982, V. 23, No. 5, pp. 362–370.
23. Tandon R. K., Srivastava A. K., Gupta U. Interrelation of biliary infection and proteins to gallstone proteins in man. *Indian Journal of Medical Research*, 1980, V. 72, pp. 398–402.
24. Wen-kun Z., Xue-gang L., Chi Z., Tao D., Jian Z. Regulation of microstructure of calcium carbonate crystals by egg white protein. *Chemical Research Chinese Universities*, 2012, V. 28, No. 2, pp. 180–185.
25. Yoo K. S., Choi H. S., Jun D.W., Lee H.L., Lee O. ., Yoon B. C., Lee K.G., Paik S. S., Kim Y. S., Lee J. MUC expression in gallbladder epithelial tissues in cholesterol-associated gallbladder disease. *Gut and Liver*, 2016, V. 10, No. 5, pp. 851–858.

Поступила в редакцию / Received 17.08.2020