

ПОКАЗАТЕЛИ ЛИПИДНОГО СПЕКТРА И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С УРОВНЕМ ОКИСЛИТЕЛЬНО МОДИФИЦИРОВАННЫХ ЛИПОПРОТЕИДОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ

Хлебус Э. Ю.^{1,2}, Мешков А. Н.¹, Ланкин В. З.³, Орловский А. А.⁴, Киселева А. В.¹, Щербакова Н. В.¹, Жарикова А. А.¹, Ершова А. И.¹, Тихазе А. К.³, Яровая Е. Б.⁴, Чазова И. Е.³, Бойцов С. А.

Цель. Изучение биохимических и генетических маркеров, ассоциированных с уровнем окислительно модифицированных липопротеидов низкой плотности (ок-ЛНП).

Материал и методы. В исследование включались пациенты с разной величиной сердечно-сосудистого риска, рассчитанного по шкале SCORE. Биохимические показатели определяли в сыворотке крови с помощью автоматического анализатора Architect C8000 (Abbott, США). Уровень ок-ЛНП в плазме крови измеряли с помощью метода твердофазного иммуноферментного анализа (тест-наборы Oxidized LDL ELISA фирмы Merckodia, Швеция). Генотипирование проводили с использованием микроматриц Cardio-MetaboChip (Illumina, США). В анализ вошло 17 однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) гена *APOB*: rs676210, rs1042034, rs6728178, rs6754295, rs673548, rs6711016, rs11902417, rs10184054, rs6544366, rs4564803, rs7557067, rs2678379, rs533617, rs679899, rs1801695, rs1367117, rs1042031. Поиск ассоциаций ОНП с уровнем ок-ЛНП проводился с применением ROC-анализа. На основе полученных результатов была выделена группа ОНП, по которой формировался суммарный балл (СБ) с учётом направленности каждого ОНП, свидетельствующий о степени генетической предрасположенности к повышенному уровню ок-ЛНП.

Результаты. В исследование было включено 717 пациентов в возрасте от 28 до 84 лет (медиана 57), мужчин было 204 (28,45%). Уровень ок-ЛНП варьировался от 21,03 до 163,72 ед./дл (медиана 68,5) и коррелировал с уровнями общего холестерина (ХС), триглицеридов (ТГ), холестерина липопротеидов низкой плотности (ХС-ЛНП), С-реактивного белка (СРБ) и аполипопротеина В-100 (АпоВ-100), при этом наибольшие коэффициенты корреляции были с АпоВ-100 и ХС-ЛНП (0,61 и 0,55, соответственно, $p < 10^{-10}$). Четырнадцать ОНП гена *APOB* (rs6728178, rs11902417, rs6544366, rs4564803, rs6754295, rs7557067, rs1042034, rs2678379, rs676210, rs673548, rs679899, rs6711016, rs10184054, rs1042031) статистически значимо ассоциировались с уровнем ок-ЛНП. Наличие сцепленных ОНП позволило ограничиться десятью из четырнадцати ОНП для формирования суммарного балла (СБ). В силу протективной направленности большинства ОНП пациенты с СБ ≤ 3 были выделены, как пациенты с генетической предрасположенностью к повышенному уровню ок-ЛНП. В ходе регрессионного анализа было показано, что при одном и том же уровне АпоВ-100 пациенты с СБ ≤ 3 имели в среднем на 10 усл. ед. выше уровень ок-ЛНП чем пациенты с СБ > 3 ($p < 10^{-10}$), а с одинаковым уровнем ХС-ЛНП на 5 усл. ед., соответственно, ($p < 10^{-6}$).

Заключение. На уровень ок-ЛНП влияет как уровень ХС-ЛНП и АпоВ-100 в крови пациентов, так и наследственная предрасположенность — сочетание аллелей ОНП гена *APOB*.

Ключевые слова: окислительно модифицированные липопротеиды низкой плотности, ХС-ЛНП, АпоВ-100, однонуклеотидный полиморфизм, атеросклероз, малоновый диальдегид, ген *APOB*.

¹ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр профилактической медицины Минздрава России, Москва; ²ФГАОУ ВО Московский физико-технический институт (государственный университет), Москва; ³ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии Минздрава России, Москва; ⁴ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия.

Хлебус Э. Ю.* — м.н.с. лаборатории молекулярной генетики, аспирант, Мешков А. Н. — к.м.н., руководитель лаборатории молекулярной генетики, Ланкин В. З. — д.б.н., профессор, руководитель лаборатории биохимии свободно-радикальных процессов, Орловский А. А. — студент механико-математического факультета кафедры теории вероятностей, Киселева А. В. — к.б.н., с.н.с. лаборатории молекулярной генетики, Щербакова Н. В. — м.н.с. лаборатории молекулярной генетики, Жарикова А. А. — м.н.с. лаборатории молекулярной генетики, Ершова А. И. — к.м.н., с.н.с. лаборатории молекулярной генетики, Тихазе А. К. — д.м.н., профессор, в.н.с. лаборатории биохимии свободно-радикальных процессов, Яровая Е. Б. — д.ф.-м.н., профессор кафедры теории вероятностей, Чазова И. Е. — академик РАН, д.м.н., профессор, директор института клинической кардиологии, Бойцов С. А. — член-корр. РАН, д.м.н., профессор, генеральный директор.

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):
elkhlebus@gmail.com

АпоА1 — аполипопротеин А1, АпоВ-100 — аполипопротеин В-100, ЛНП — липопротеиды низкой плотности, Лп(а) — липопротеин (а), МДА — малоновый диальдегид, ок-ЛНП — окислительно модифицированные липопротеиды низкой плотности, ОНП — однонуклеотидный полиморфизм, СБ — суммарный балл, СРБ — С-реактивный белок, ТГ — триглицериды, ХС — общий холестерин, ХС-ЛВП — холестерин липопротеидов высокой плотности, ХС-ЛНП — холестерин липопротеидов низкой плотности.

Рукопись получена 21.09.2017

Рецензия получена 22.09.2017

Принята к публикации 25.09.2017

Российский кардиологический журнал 2017, 10 (150): 49–54

<http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2017-10-49-54>

LIPID PROFILE AND GENETIC MARKERS ASSOCIATED WITH THE LEVEL OF OXIDIZED LOW DENSITY LIPOPROTEIDES

Khlebus E. Yu.^{1,2}, Meshkov A. N.¹, Lankin V. Z.³, Orlovsky A. A.⁴, Kiseleva A. V.¹, Shcherbakova N. V.¹, Zharikova A. A.¹, Ershova A. I.¹, Tikhaze A. K.³, Yarovaya E. B.⁴, Chazova I. E.³, Boytsov S. A.

Aim. To assess biochemical and genetic markers associated with the level of oxidized low density lipoproteides (oxLDL).

Material and methods. Patients with various cardiovascular risk according to the SCORE scale were included in this study. Biochemical parameters were measured in blood serum with automatic analyzer Architect C8000 (Abbott, USA). OxLDL level was measured with the hard-phase immune-enzyme assay Oxidized LDL ELISA (Merckodia, Sweden). Genotyping was performed via the Cardio-MetaboChip microarrays (Illumina, USA). Seventeen single-nucleotide polymorphisms (SNP) of the *APOB* gene were included into analysis: rs676210, rs1042034, rs6728178,

rs6754295, rs673548, rs6711016, rs11902417, rs10184054, rs6544366, rs4564803, rs7557067, rs2678379, rs533617, rs679899, rs1801695, rs1367117, rs1042031. The association study between SNP and oxLDL level was performed by the ROC-analysis. Based on results, the group of SNP was selected. According to this group, the total score (TS) showing the level of genetic susceptibility to an increased oxLDL level was calculated.

Results. The present study included 717 patients ranging from 28 to 84 years old (with the median of 57), 204 men (28.45%). The oxLDL level varied from 21,03 to 163,72 U/dL (median 68,5) and correlated with the levels of total cholesterol (TC),

triglycerides (TG), low density cholesterol (LDL-C), C-reactive protein (C-RP) and apolipoprotein B-100 (ApoB-100). The highest coefficients of correlations ($p < 10^{-10}$) were derived for ApoB-100 and LDL-C (0,61 and 0,55, respectively). Fourteen SNPs of the *APOB* gene (rs6728178, rs11902417, rs6544366, rs4564803, rs6754295, rs7557067, rs1042034, rs2678379, rs676210, rs673548, rs679899, rs6711016, rs10184054, rs1042031) were significantly associated with the oxLDL. For the TS calculation we used only ten out of fourteen SNP because of the presence of linked SNP. Patients with TS ≤ 3 were referred to as those who had genetic susceptibility to the increased oxLDL level due to the protective role of most SNP. The regression study has revealed that patients with the same ApoB-100 level and with TS ≤ 3 had higher oxLDL level in average of 10 units than the patients with the TS > 3 ($p < 10^{-10}$), and the patients with the same LDL-C level by 5 units, respectively ($p < 10^{-6}$).

Conclusion. The oxLDL level depends on the level of LDL-C and ApoB-100 in blood, as well as on the genetic susceptibility — a combination of the SNP of *APOB* gene.

Russ J Cardiol 2017, 10 (150): 49–54

<http://dx.doi.org/10.15829/1560-4071-2017-10-49-54>

Key words: oxidized low density lipoprotein, LDL-C, ApoB-100, single-nucleotide polymorphism, atherosclerosis, malondialdehyde, *APOB*.

¹National Research Center for Preventive Medicine of the Ministry of Health, Moscow; ²Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Moscow;

³National Center Research of Cardiology of the Ministry of Health, Moscow;

⁴M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia.

Заболевания сердечно-сосудистой системы атеросклеротического генеза продолжают занимать первое место среди неинфекционных болезней человека. В связи с этим, изучение новых факторов риска возникновения атеросклероза и его осложнений не теряет свою актуальность. Общеизвестно, что начальные (предатерогенные) повреждения связаны с возникновением так называемых “пенистых клеток” (зон липоидоза) в стенке сосудов [1, 2]. Перегруженные липид-содержащими вакуолями пенистые клетки образуются при неконтролируемом захвате макрофагами окислительно модифицированных липопротеидов низкой плотности (ок-ЛНП) [1, 2]. Макрофаги содержат рецепторы к ок-ЛНП, включая скавенджер рецепторы, которые обеспечивают эффективную элиминацию окислительно модифицированных частиц липопротеидов низкой плотности (ЛНП) из кровотока [3, 4]. Ведущую роль в атерогенной окислительной модификации ЛНП играет не накопление ацилгидропероксидов в фосфолипидах наружного слоя частиц ЛНП, а химическая модификация единственного белка ЛНП — апопротеина В-100 при образовании вторичных продуктов свободнорадикального окисления липидов ЛНП — 4-гидроксиноненаля, малонового диальдегида (МДА) и других природных дикарбониллов [3, 4]. Ок-ЛНП являются факторами риска возникновения ишемической болезни сердца [5, 6], также показано, что диагностическая ценность определения уровня ок-ЛНП значительно превышает таковую при определении общепринятых биохимических маркеров атеросклероза — уровня общего холестерина и холестерина ЛНП [7]. Гиперлипидемия может индуцировать повышение уровня ок-ЛНП [2]. Ранее показано, что повышенный уровень ок-ЛНП также может быть генетически детерминирован и связан с вариантами гена *APOB* [8]. Однако совместный вклад липидных и генетических факторов в повышенный уровень ок-ЛНП ранее не изучался.

Целью работы было изучение биохимических и генетических маркеров, ассоциированных с уровнем ок-ЛНП у пациентов с различной величиной сердечно-сосудистого риска, рассчитанного по шкале

(SCORE) [9]. Отличительной особенностью работы является применение ROC-анализа [10] для исследования связи генетических маркеров с показателями липидного спектра, позволяющее находить отрезные точки уровней ок-ЛНП, аполипопротеина В-100 (АпоВ-100) и холестерина ЛНП, для разделения по генотипам — как по каждому из однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) в отдельности, так и по введенному интегральному показателю, суммирующему аллели нескольких ОНП — суммарному баллу (СБ).

Материал и методы

Исследование выполняли в рамках реализации научно-исследовательской работы “Апробация и внедрение в практику амбулаторно-поликлинических учреждений новых алгоритмов предупреждения, диагностики и лечения атеросклероза на примере ЗАО г. Москвы”. Основные аспекты дизайна и методов исследования опубликованы ранее [11, 12].

В данной работе использовали данные 717 пациентов с разной величиной сердечно-сосудистого риска, рассчитанного по шкале (SCORE) [9], у которых было проведено измерение уровня ок-ЛНП, и определены варианты гена *APOB*.

Анализ факторов риска включал: учет возраста, пола, показателя индекса массы тела, окружности талии, наличие/отсутствие артериальной гипертензии, курения, метаболического синдрома, сахарного диабета, перенесенного инфаркта миокарда, острых нарушений мозгового кровообращения.

Забор крови проводили натощак, после 12-часового периода голодания. Уровни общего холестерина (ХС), триглицеридов (ТГ), холестерина липопротеидов высокой плотности (ХС-ЛВП), холестерина липопротеидов низкой плотности (ХС-ЛНП), аполипопротеина В-100 (АпоВ-100), аполипопротеина А1, С-реактивного белка (СРБ) и липопротеина (а) определяли в сыворотке крови с помощью автоматического анализатора Architect С8000 (Abbott, США).

Уровень ок-ЛНП определяли в плазме крови, взятой с ЭДТА (1 мг/мл) в качестве антикоагулянта и антиоксиданта. Определение проводили с помощью

метода твердофазного иммуноферментного анализа (тест-наборы Oxidized LDL ELISA (Mercodia, Швеция)), используя планшетный спектрофотометр BioTek EL 808 (США). Специфичность связывания с моноклональными антителами mAb-4E6, используемыми в тест-наборах Mercodia Oxidized LDL ELISA (Швеция), проверялась для МДА-модифицированных ЛНП, а также глиоксаль-модифицированных ЛНП и метилглиоксаль-модифицированных ЛНП. ЛНП выделяли из плазмы крови здоровых доноров при помощи дифференциального ультрацентрифугирования в градиенте плотности NaBr в роторе Ti-50 на рефрижераторной ультрацентрифуге Beckman L-8 (США) по модифицированному методу [13], после чего полученные ЛНП инкубировали в течение 3 часов с МДА, глиоксалем или метилглиоксалем и диализовали в течение 12 часов при 4° С [14].

ДНК для генотипирования была выделена из 300 мкл замороженной крови с ЭДТА при помощи набора Qiagen DNA blood mini kit. Двести нанограммов геномной ДНК было использовано для проведения генотипирования на микроматрицах Cardio-MetaboChip (Illumina, США) по протоколу к данным микроматрицам Infinium HD Ultra. Сканирование микроматриц проводили на приборе BeadArrayReader (Illumina, США) при помощи программы BeadScan. Обработка данных генотипирования, включающая отбор исследуемых полиморфизмов и создание общей таблицы с данными для всех пациентов, проводилась с помощью языка программирования R v. 3.0.1 (<http://www.rproject.org>). В дальнейший анализ включались 17 ОНП гена *APOB*, для которых ранее в работе Mäkelä KM, et al. (2013) изучалась ассоциация с уровнем ок-ЛНП: rs676210, rs1042034, rs6728178, rs6754295, rs673548, rs6711016, rs11902417, rs10184054, rs6544366, rs4564803, rs7557067, rs2678379, rs533617, rs679899, rs1801695, rs1367117, rs1042031 [8].

Для статистической обработки полученных результатов использовали пакеты статистических программ Statistica v. 10.0 и SPSS v. 20. Проверка исследуемых признаков на нормальность проводилась с помощью критерия Шапиро-Уилка. При отсутствии нормальной распределенности признака для представления данных использовались медиана и интерквартильный размах (25-75 процентиля). Для оценки взаимосвязи признаков вычислялся коэффициент корреляции Спирмена.

Кодирование генотипов осуществлялось следующим образом: 0 — частая гомозигота, 1 — гетерозигота, 2 — минорная гомозигота. С использованием ROC-анализа вначале проводили поиск первой отрезной точки уровня каждого из таких показателей как ок-ЛНП, АпоВ-100, холестерина ЛНП, позволяющей отделять частые гомозиготы (0) от гетерозигот и минорных гомозигот (1 и 2), а затем — второй отрезной точки для отделения частых гомозигот

и гетерозигот (0 и 1) от минорных гомозигот (2). Вывод о существовании таких точек делали в том случае, если отвергалась гипотеза о равенстве величины AUC (Area under curve — площадь под соответствующей ROC-кривой) значению 0,5.

Если была выявлена статистически значимая связь между полиморфизмом и уровнем показателя, то такой полиморфизм включался в суммарный балл (СБ) с учетом его направленности. Направленность полиморфизмов определялась с помощью критерия Краскала-Уоллиса с зависимой переменной, в качестве которой был использован уровень ок-ЛНП. Полиморфизм считался положительно направленным, если с повышенным уровнем ок-ЛНП у него были ассоциированы частые гомозиготы (0), и отрицательно направленным — если минорные гомозиготы (2). Для каждой из цепочек сцепленных (совпадающих или совпадающих с точностью до взаимной замены “нулей” и “двоек”) полиморфизмов, в суммарный балл включался только один из полиморфизмов. По вычисленному СБ пациенты разделялись на две группы: со значением СБ меньшим или равным медиане и с СБ большим медианы. В данных группах с помощью регрессионного анализа исследовалась связь АпоВ-100 и ХС-ЛНП с уровнем окисленных липопротеидов низкой плотности. Уровень значимости для проверяемых статистических гипотез принимался равным 0,05.

Результаты и обсуждение

Учитывая, что при окислительном стрессе, сопровождающем развитие атеросклероза, и сахарном диабете в плазме крови может накапливаться не только МДА, но и другие низкомолекулярные дикарбонилы, включая гомолог МДА глиоксаль и изомер МДА метилглиоксаль, и что глиоксаль и метилглиоксаль, подобно МДА, могут вызывать атерогенную модификацию ЛНП [2, 3, 13, 14], мы исследовали специфичность связывания МДА-модифицированных ЛНП, а также глиоксаль-модифицированных ЛНП и метилглиоксаль-модифицированных ЛНП с моноклональными антителами mAb-4E6, используемыми в тест-наборах Mercodia Oxidized LDL ELISA (Швеция). Выявлено, что с моноклональными антителами mAb-4E6 преимущественно связываются МДА-модифицированные ЛНП, тогда как глиоксаль-модифицированные ЛНП и метилглиоксаль-модифицированные ЛНП с этими антителами практически не взаимодействуют (рис. 1). Следовательно, используемые нами тест-наборы Mercodia Oxidized LDL ELISA (Швеция) способны определять не любые окисленные ЛНП, а преимущественно МДА-модифицированные ЛНП, ввиду высокой специфичности взаимодействия моноклональных антител mAb-4E6 с МДА-модифицированными ЛНП.

Клиническая характеристика 717 пациентов, включенных в исследование, представлена в таб-

Таблица 1

Клиническая характеристика 717 пациентов, включенных в исследование (медиана (квартилы), %)

Клинические параметры	Все пациенты, n=717
Возраст, лет	57 (51-63)
Количество мужчин, %	204 (28,45%)
Количество пациентов с АГ, %	582 (81,17%)
Количество пациентов с ИМ, %	69 (9,62%)
Статус курения, %	551 (76,85%) — не курит; 62 (8,65%) — бросили; 102 (14,23%) — курят
Количество пациентов с СД, %	112 (15,62%)
Количество пациентов с ОНМК, %	18 (2,51%)
Индекс массы тела, кг/м ²	33,14 (30,04-37,19)
ХС, ммоль/л	5,90 (5,18-6,84)
ТГ, ммоль/л	1,58 (1,13-2,16)
ХС-ЛНП, ммоль/л	3,60 (2,92-4,38)
ХС-ЛВП, ммоль/л	1,34 (1,14-1,58)
СРБ, мг/дл	0,23 (0,12-0,41)
Лп(а), мг/дл	11,9 (5,3-34,5)
АпоА1, мг/дл	162 (144-183)
АпоВ-100, мг/дл	102 (87-122)
ок-ЛНП, ед./дл	68,52 (55,67-85,52)

Сокращения: АГ — артериальная гипертензия, АпоА1 — аполипопротеин А1, АпоВ-100 — аполипопротеин В-100, ИМ — инфаркт миокарда, Лп(а) — липопротеин (а), ок-ЛНП — окисленные липопротеиды низкой плотности, ОНМК — острые нарушения мозгового кровообращения, СД — сахарный диабет, СРБ — С-реактивный белок, ТГ — триглицериды, ХС — общий холестерин, ХС-ЛВП — холестерин липопротеидов высокой плотности, ХС-ЛНП — холестерин липопротеидов низкой плотности.

Таблица 2

Корреляция уровня ок-ЛНП с липидными показателями и СРБ

Липидный фактор	r	p
ХС	0,54	0,000
ТГ	0,33	0,000
ХС-ЛНП	0,55	0,000
ХС-ЛВП	-0,07	0,055
СРБ	0,14	0,000
Лп(а)	0,02	0,607
АпоА1	0,03	0,389
АпоВ-100	0,61	0,000

Сокращения: р — уровень значимости, r — коэффициент корреляции Спирмена, АпоА1 — аполипопротеин А1, АпоВ-100 — аполипопротеин В-100, Лп(а) — липопротеин (а), СРБ — С-реактивный белок, ТГ — триглицериды, ХС — общий холестерин, ХС-ЛВП — холестерин липопротеидов высокой плотности, ХС-ЛНП — холестерин липопротеидов низкой плотности.

лице 1. Уровень ок-ЛНП для этих пациентов варьировался от 21,03 до 163,7 ед./дл (медиана 68,5) и статистически значимо коррелировал с уровнем ХС, ТГ, ХС-ЛНП, СРБ и АпоВ-100 (табл. 2).

При анализе 17 полиморфизмов гена *АРОВ* выявлены два сцепленных набора полиморфизмов (rs2678379, rs676210, rs673548) и (rs6544366, rs4564803,

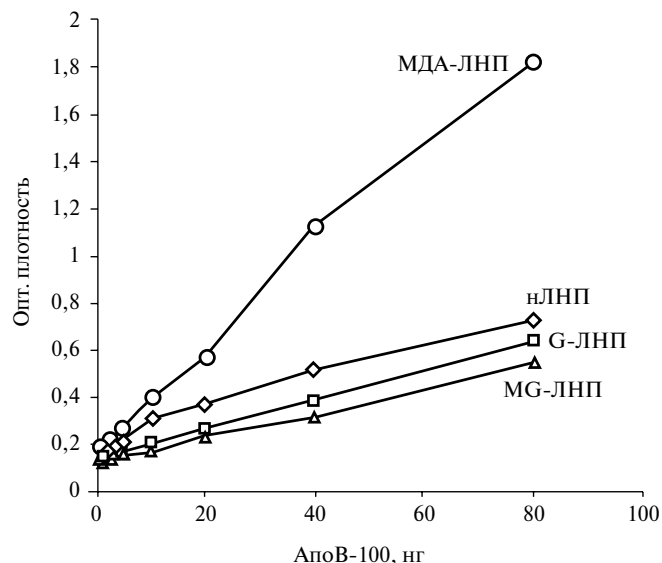


Рис. 1. Специфичность связывания нативных ЛНП (нЛНП), МДА-модифицированных ЛНП (МДА-ЛНП), глиоксаль-модифицированных ЛНП (G-ЛНП) и метилглиоксаль-модифицированных ЛНП (MG-ЛНП) с антителами mAb-4E6, используемыми в тест-наборах Mercodia Oxidized LDL ELISA (Швеция).

rs7557067). Из них в дальнейшее исследование включены rs676210 и rs6544366. Две отрезные точки уровня ок-ЛНП выявлены для следующих полиморфизмов: rs6728178, rs11902417, rs6544366, rs6754295, rs1042034, rs676210, rs679899. Только первая отрезная точка уровня ок-ЛНП, отличающая нормальные гомозиготы (0) от гетерозигот и мутантных гомозигот (1 и 2), обнаружилась для rs6711016 и rs10184054. Только вторая отрезная точка уровня ок-ЛНП, отличающая нормальные гомозиготы и гетерозиготы (0 и 1) от мутантных гомозигот (2) обнаружилась для rs1042031. При этом, все десять полиморфизмов оказались статистически значимо связаны между собой, что удалось установить с помощью применения критерия хи-квадрат Пирсона к таблицам сопряженности полиморфизмов. При проведении ROC-анализа не удалось выявить статистически значимых ассоциаций между изучаемыми полиморфизмами гена *АРОВ* и уровнями АпоВ-100 и ХС-ЛНП и, как следствие, выявить отрезные точки.

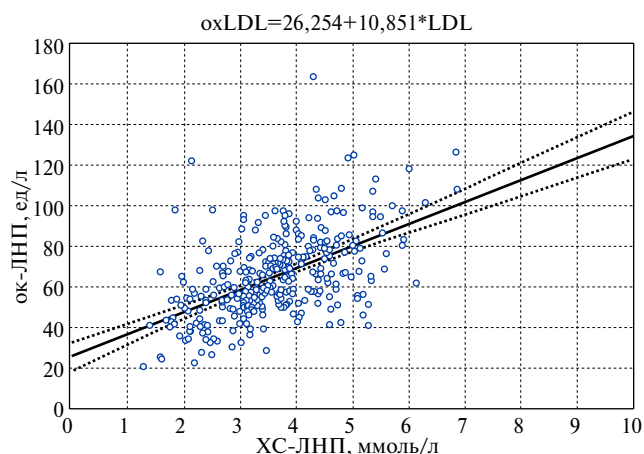
Суммарный балл вычислялся как сумма восьми кодировок положительно направленных полиморфизмов, имеющих протективный эффект, и двух кодировок отрицательно направленных полиморфизмов, имеющих негативный эффект, изменённых взаимной заменой 0 на 2, из таблицы 3, СБ=rs6728178+rs11902417+rs6544366+rs6754295+(2-rs1042034)+rs676210+rs679899+rs6711016+rs10184054+(2-rs1042031). Медиана суммарного балла равнялась 3. Таким образом, пациенты с СБ ≤3 были выделены как пациенты с генетической предрасположенностью к повышенному содержанию ок-ЛНП.

Таблица 3

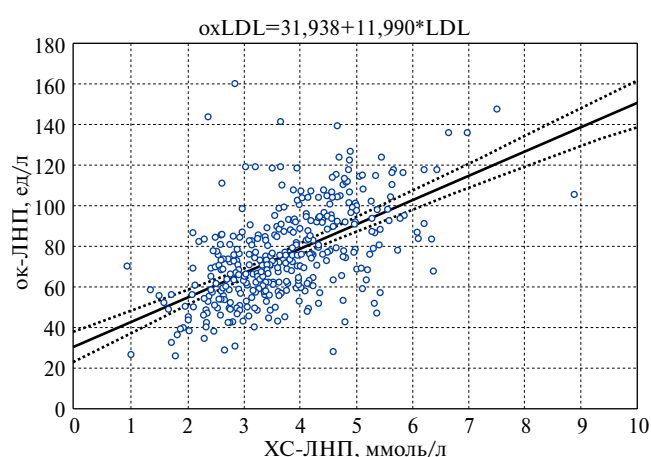
Площадь под ROC-кривой (AUC), где в качестве непрерывной переменной был выбран уровень ок-ЛНП

Сравниваемые статусы	Две отрезные точки							Одна отрезная точка		
	rs6728178	rs11902417	rs6544366	rs6754295	rs1042034*	rs676210	rs679899	rs6711016	rs10184054	rs1042031*
{0}_{1,2}	0,626	0,631	0,626	0,628	0,649	0,649	0,56	0,596	0,606	-
{0,1}_{2}	0,649	0,679	0,656	0,656	0,629	0,627	0,572	-	-	0,705

Примечание: * — ОНП с негативным эффектом, для которых в случае с первой отрезной точкой за положительный случай выбирался не {0}, а {1,2}, со второй — не {0,1}, а {2}. Приведены статистически значимые результаты ($p < 0,05$).



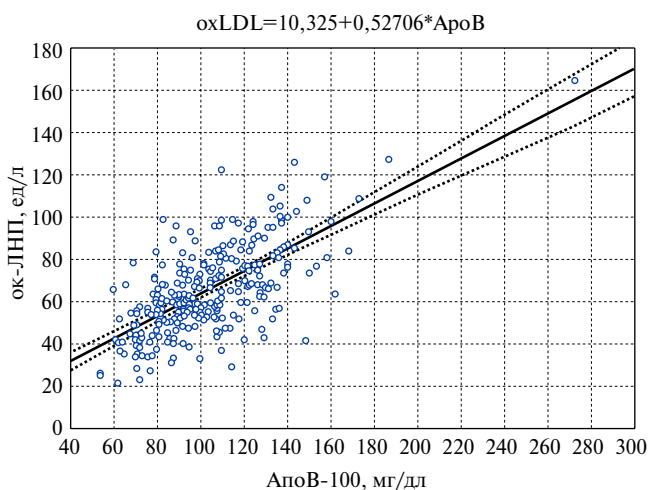
Панель А.



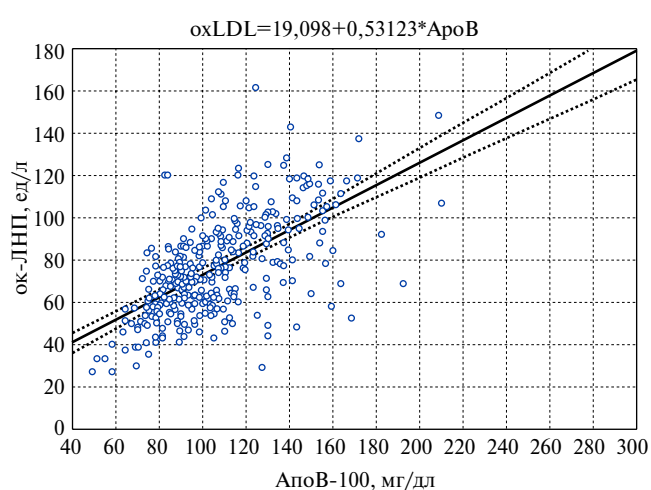
Панель В.

Рис. 2. Содержание ок-ЛНП в зависимости от уровня ХС-ЛНП при отсутствии (СБ >3) (панель А) и наличии (СБ ≤3) (панель В) генетической предрасположенности.

Примечание: представлены линейные модели с 95%-доверительными интервалами для линии регрессии.



Панель А.



Панель В.

Рис. 3. Содержание ок-ЛНП в зависимости от уровня ApoB-100 при отсутствии (СБ >3) (панель А) и наличии (СБ ≤3) (панель В) генетической предрасположенности.

Примечание: представлены линейные модели с 95%-доверительными интервалами для линии регрессии.

Учитывая, что в общей группе пациентов из липидных показателей наибольшие коэффициенты корреляции с уровнем ок-ЛНП были для уровней ApoB-100 и ХС-ЛНП, мы рассчитали коэффициенты корреляции между уровнем ок-ЛНП и уровнем ApoB-100,

и между уровнем ок-ЛНП и ХС-ЛНП отдельно для пациентов с СБ ≤3 и СБ >3 (рис. 2 и 3). Для ApoB-100 коэффициенты корреляции составили 0,67 и 0,62, соответственно, и при сравнении достоверно не различались. В ходе регрессионного анализа не выяв-

лено статистически значимых различий в угловых коэффициентах линий регрессии, но при этом выявлено статистически значимое различие в свободных членах регрессионных прямых ($p < 10^{-10}$). Отсюда следует, что при одном и том же уровне белка АпоВ-100 у пациентов с генетической предрасположенностью уровень ок-ЛНП будет в среднем на 10 усл. ед. выше, чем без генетической предрасположенности. Отсутствие статистической значимости в угловых коэффициентах линий регрессии свидетельствует о том, что регрессионные уравнения можно считать параллельными и с повышением уровня АпоВ-100 повышается уровень ок-ЛНП как в группе с генетической наследственной предрасположенностью, так и без нее. Для уровня ХС-ЛНП коэффициенты корреляции составили 0,54 и 0,55, соответственно, и так же при сравнении достоверно не различались, для угловых коэффициентов линий регрессии различий не было. Были выявлены статистически значимые различия в свободных членах регрессионных уравнений. При одном и том же уровне ХС-ЛНП у пациентов с генетической предрасположенностью уровень ок-ЛНП будет в среднем на 5 усл. ед. выше, чем без генетической предрасположенности ($p < 10^{-6}$).

Заключение

Таким образом, уровень ок-ЛНП связан как с уровнем ХС-ЛНП и уровнем АпоВ-100 в крови пациентов, так и с наследственной предрасположенностью — сочетанием аллелей изученных нами десяти ОНП гена *APOB*. Известно, что частицы ок-ЛНП могут проникать в клетки стенки сосудов и вызывать развитие предатерогенных повреждений

(липоидоз) [15]. Тем не менее, механизм влияния однонуклеотидных полиморфизмов гена *APOB* на уровень ок-ЛНП не изучен. Как было показано в данной работе, исследованные ОНП не влияют на уровень ХС-ЛНП и АпоВ-100 сыворотки крови. Можно предположить, что эти ОНП способствуют изменению вторичной и третичной структуры АпоВ-100, изменяя его расположение в фосфолипидном монослое, однако это предположение требует дальнейшего изучения.

- Тест-наборы Mercodia Oxidized LDL ELISA (Швеция) способны определять не любые окисленные ЛНП, а преимущественно МДА-модифицированные ЛНП, ввиду высокой специфичности взаимодействия моноклональных антител mAb-4Е6 с МДА-модифицированными ЛНП.

- Уровень окислительно модифицированных липопротеидов низкой плотности с высокой степенью коррелирует с уровнем АпоВ-100 и ХС-ЛНП.

- Десять ОНП гена *APOB* (rs6728178, rs11902417, rs6544366, rs6754295, rs1042034, rs676210, rs679899, rs6711016, rs10184054, rs1042031) статистически значимо ассоциированы с уровнем ок-ЛНП, вошли в формирование СБ.

- В ходе регрессионного анализа было показано, что при одном и том же уровне АпоВ-100 пациенты с СБ ≤ 3 имели в среднем на 10 усл. ед. выше уровень ок-ЛНП чем пациенты с СБ > 3 ($p < 10^{-10}$), а с одинаковым уровнем ХС-ЛНП на 5 усл. ед., соответственно, ($p < 10^{-6}$).

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 14-15-00245.

Литература

1. Linton MF, Yancey PG, Davies SS, et al. The role of lipids and lipoproteins in atherosclerosis. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, et al., ed. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc, 2000-2015 Dec 24.
2. Lankin VZ, Tikhaze AK. Role of oxidative stress in the genesis of atherosclerosis and diabetes mellitus: A personal look back on 50 years of research. *Curr Aging Sci*, 2017; 10 (1): 18-25.
3. Lankin VZ, Tikhaze AK, Konovalova GG, et al. Aldehyde-dependent modification of low density lipoproteins. In: Handbook of Lipoprotein Research. NY: Nova Sci, 2010: 85-107.
4. Lankin VZ, Tikhaze AK, Kumskova EM. Macrophages actively accumulate malonyldialdehyde-modified but not enzymatically oxidized low density lipoprotein. *Mol Cell Biochem*, 2012; 365 (1-2): 93-8.
5. Huang Y, Hu Y, Mai W, et al. Plasma oxidized low-density lipoprotein is an independent risk factor in young patients with coronary artery disease. *Dis Markers*, 2011; 31 (5): 295-301.
6. Tsimikas S. Oxidized low-density lipoprotein biomarkers in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*, 2006; 8 (1): 55-61.
7. Johnston N, Jernberg T, Lagerqvist B, et al. Improved identification of patients with coronary artery disease by the use of new lipid and lipoprotein biomarkers. *Am J Cardiol*, 2006; 97 (5): 640-5.
8. Mäkelä KM, Seppälä I, Hernesniemi JA, et al. Genome-wide association study pinpoints a new functional apolipoprotein B variant influencing oxidized low-density lipoprotein levels but not cardiovascular events: AtheroRemo Consortium. *Circ Cardiovasc Genet*, 2013; 6 (1): 73-81.
9. Conroy RM, Pyörälä K, Fitzgerald AP, et al. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. *Eur Heart J*, 2003; 24 (11): 987-1003.
10. Fawcett T. ROC graphs: notes and practical considerations for data mining researchers. Technical report HPL-2003-4, Intelligent Enterprise Technologies Laboratory, HP Laboratories Palo Alto, 2003.
11. Urazalina SZh, Titov VN, Vlasik TN, et al. Relationship between concentration of lipoprotein-associated secretory phospholipase A2 and markers of subclinical atherosclerotic lesion of the arterial wall in patients with low and moderate risk by SCORE scale. *Ter Arkh*, 2011; 83 (9): 29-35. (In Russ.) Уразалина С.Ж., Титов В.Н., Власик Т.Н. и др. Взаимосвязь концентрации ассоциированной с липопротеинами секреторной фосфолипазы А2 с маркерами субклинического атеросклеротического поражения артериальной стенки у пациентов с низким и средним риском по шкале SCORE. *Терапевтический архив*, 2011, 9: 29-35.
12. Urazalina SZh, Rogoz AN, Balahonova TV, et al. Biochemical parameters and markers of preclinical pathology of carotid artery wall in patients with different levels of cardiovascular risk by the ESH/ESC scale (2003, 2007). *Cardiovascular Therapy and Prevention*, 2011; 7: 74-80. (In Russ.) Уразалина С.Ж., Рогоза А.Н., Балахонова Т.В. и др. Биохимические показатели, маркеры доклинического поражения стенки сонных артерий у пациентов с различной степенью сердечно-сосудистого риска по шкале EOAГ/ЕОК (2003, 2007). *Кардиоваскулярная терапия и профилактика* 2011, 7: 74-80.
13. Lankin V, Konovalova G, Tikhaze A, et al. The initiation of free radical peroxidation of low-density lipoproteins by glucose and its metabolite methylglyoxal: a common molecular mechanism of vascular wall injury in atherosclerosis and diabetes. *Mol Cell Biochem*, 2014; 395 (1-2): 241-52.
14. Lankin VZ, Tikhaze AK, Kapel'ko VI, et al. Mechanisms of oxidative modification of low density lipoproteins under conditions of oxidative and carbonyl stress. *Biochemistry (Moscow)*, 2007; 72 (10): 1081-90.
15. Rianilo S, Vindigni G, Biocca S. Cholesterol level regulates lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 function. *Biomedical Spectroscopy and Imaging*, 2016; 5: S87-S99.