

На правах рукописи

Шогенова Марьяна Хабасовна

**Проатерогенные аутоантигены и антитела к ним у
больных с коронарным атеросклерозом: возможность
использования в клинической практике**

14.01.05 – «Кардиология»

03.01.04 – «Биохимия»

*Автореферат диссертации на соискание
ученой степени кандидата медицинских наук*

Москва – 2015

Работа выполнена в отделе проблем атеросклероза НИИ Клинической кардиологии им. А.Л. Мясникова ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Министерства здравоохранения РФ.

Научные руководители:

Доктор медицинских наук, профессор

Владимир Геннадьевич Наумов

Доктор медицинских наук, профессор

Валерий Павлович Масенко

Официальные оппоненты:

Доктор медицинских наук, профессор **Ивков Николай Николаевич** – профессор кафедры биохимии ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» МЗ РФ.

Доктор медицинских наук, профессор **Бубнова Марина Геннадьевна** - руководитель отдела реабилитации и вторичной профилактики сочетанной патологии ФГБУ «Государственный научно-исследовательский центр профилактической медицины» МЗ РФ.

Ведущая организация: Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный медико - стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» МЗ РФ.

Защита состоится «18» февраля 2016 года в 13³⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 208.073.04 по присуждению учёной степени кандидата медицинских наук в ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» МЗ РФ (121552, Москва, ул. 3-я Черепковская д.15А).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «РКНПК» МЗ РФ.

Автореферат разослан «___» «_____» 201 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

Кандидат медицинских наук

Сорокин Евгений Владимирович

Характеристика работы

Актуальность проблемы

По оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются основной причиной смерти во всем мире. Ожидается, что к 2020 году острый инфаркт миокарда и мозговой инсульт станут лидирующими причинами смертности в мире, которая составит около 20 млн человек в год, а к 2030 году возрастет до 24 млн человек в год [The World Health Report 2014]. Согласно статистическим данным, в Российской Федерации ССЗ составляют 57% в структуре общей смертности. Среди них ведущее место занимают ишемическая болезнь сердца (ИБС) 50,1% и мозговые инсульты (МИ) 34,5%. В большинстве случаев причиной поражения сердечно-сосудистой системы и главной причиной ИБС является атеросклероз.

Для правильной и своевременной профилактики любых заболеваний необходимо четкое понимание причин их вызывающих. Благодаря накопленным в течение последних десятилетий экспериментальным данным произошел прогресс в понимании механизмов развития атеросклеротического процесса. В настоящее время атеросклероз рассматривается как полиэтиологическое заболевание со сложным патогенезом. Количество факторов риска, влияющих на развитие атеросклероза, неуклонно растет. В качестве серьезных кандидатов на роль индукторов иммунного ответа предлагаются различные факторы – окисленные липопротеиды низкой плотности (ОкЛНП), антитела к ним (Ат-окЛНП), β 2-гликопротеин I (β 2ГП), антитела к β 2ГП (Ат- β 2ГП), белки теплового шока (HSP), антитела к HSP (Ат-HSP).

Все больше данных свидетельствуют о том, что ОкЛНП обладают более атерогенными свойствами, чем нативные липопротеиды низкой плотности (ЛНП) [Ланкин В.З. и соавт., 2008]. ОкЛНП способствуют активации макрофагов и внутриклеточному накоплению эфиров холестерина, оказывают цитотоксическое действие на эндотелиальные клетки, увеличивают тромбоцитарную активность, стимулируют миграцию и пролиферацию гладкомышечных клеток, тем самым инициируя развитие атеросклеротического процесса [Mizuno Y, et al., 2011]. В связи с чем, высказывается предположение, что содержание ОкЛНП является наиболее важным диагностическим маркером атеросклероза, чем уровень общего холестерина (ХС) и ЛНП. ОкЛНП считаются ключевыми факторами локального воспаления и дестабилизации атеросклеротических бляшек. Окислительная модификация индуцирует образование иммуногенных эпитопов в молекулах ЛНП, что приводит к

образованию специфических антител против них. Доказана способность ОкЛНП взаимодействовать с Ат-окЛНП, образуя иммунные комплексы, оказывающие дополнительное повреждающее действие на эндотелий.

Последнее время все чаще обсуждается вопрос о возможности включения в систему стратификации риска данных об уровне проатерогенных антигенов и аутоантител к ним с целью усовершенствования современной оценки степени риска ССЗ. Рассматривается новый подход к лечению и профилактике атеросклероза – перспектива создания противоатеросклеротической вакцины. Основная стратегия иммуномодуляции состоит в подавлении проатерогенных и активации атеропротекторных иммунных факторов. Однако следует признать, что роль ОкЛНП и Ат-окЛНП в атеросклеротическом процессе до сих пор четко не выяснена. Сложность состоит в том, что имеющиеся в литературе данные о роли ОкЛНП и Ат-окЛНП в атеросклеротическом процессе, зачастую, противоречивы. Согласно различным источникам, аутоантитела к проатерогенным аутоантигенам могут оказывать прямо противоположные эффекты: проатерогенный и атеропротекторный [Uusitupa M, et al., 1996, Lehtimäki T, et al., 1999]. Поэтому вопрос о роли проатерогенных антигенов и антител к ним в атерогенезе по сей день остается актуальным, как и поиск средств воздействия на данные показатели.

Цель исследования:

Определить содержание и оценить целесообразность использования в клинической практике сывороточных проатерогенных аутоантигенов и антител к ним у больных с различной выраженностью коронарного атеросклероза.

Задачи:

1. Определить и сравнить содержание в сыворотке крови окисленных ЛНП и антител к ним у больных со стенозирующим и нестенозирующим коронарным атеросклерозом и здоровых лиц.
2. Определить корреляционную зависимость между уровнем окисленных ЛНП и уровнем антител к ним у больных со стенозирующим и нестенозирующим коронарным атеросклерозом и здоровых лиц.
3. Сопоставить содержание в сыворотке крови окисленных ЛНП и антител к ним с уровнем общего холестерина, липопротеидов низкой плотности, липопротеидов высокой плотности, высокочувствительного С-реактивного белка (вчСРБ), интерлейкина-6 (ИЛ-6) у больных со стенозирующим и нестенозирующим коронарным атеросклерозом и здоровых лиц.

4. Определить и сравнить содержание в сыворотке крови аутоантител к ЛНП человека, ЛНП, модифицированных метилглиоксалем, ЛНП, модифицированных малоновым диальдегидом, IgG, модифицированных метилглиоксалем, IgG, модифицированных малоновым диальдегидом и мономерного СРБ (Моно-СРБ) у больных со стенозирующим и нестенозирующим коронарным атеросклерозом и здоровых лиц.

5. Определить и сравнить содержание в сыворотке крови антител к β 2-гликопротеину I и антител к белку теплового шока 60 у больных со стенозирующим и нестенозирующим коронарным атеросклерозом и здоровых лиц.

Научная новизна

Впервые показано отсутствие различий в уровне сывороточных окисленных ЛНП у больных со стенозирующим и нестенозирующим коронарным атеросклерозом, добровольцев старше 50 лет без клинических признаков ИБС и молодых практически здоровых добровольцев. Продемонстрировано, что уровень антител к окисленным ЛНП у молодых практически здоровых лиц достоверно выше, чем у больных со стенозирующим коронарным атеросклерозом. Установлено, что уровень IgG, модифицированных малоновым диальдегидом и метилглиоксалем, у молодых практически здоровых лиц достоверно выше, чем у больных со стенозирующим и нестенозирующим коронарным атеросклерозом.

Впервые показано отсутствие взаимосвязи между уровнем окисленных ЛНП и уровнем антител к ним у больных со стенозирующим и нестенозирующим коронарным атеросклерозом и у молодых практически здоровых лиц. Установлено отсутствие связи между уровнем окисленных ЛНП и антител к ним с показателями липидного профиля и маркерами воспаления у больных со стенозирующим и нестенозирующим коронарным атеросклерозом и у молодых практически здоровых лиц. Продемонстрировано, что уровень ОкЛНП у сопоставимых по возрасту больных со стенозирующим и нестенозирующим атеросклерозом КА, находящихся на гиполипидемической терапии статинами, и у добровольцев старше 50 лет, не принимающих статины, достоверно не различается.

Практическая значимость

Результаты работы показали, что уровни окисленных ЛНП, ЛНП модифицированных малоновым диальдегидом и метилглиоксалем у больных

ИБС не могут быть использованы в клинической практике для оценки тяжести коронарного атеросклероза. Тем не менее, следует учитывать, что у больных с различной степенью атеросклеротического поражения коронарных артерий уровень антител к окисленным ЛНП, IgG модифицированных малоновым диальдегидом и метилглиоксалем достоверно ниже, чем у молодых практически здоровых лиц.

Апробированы методы определения ЛНП, модифицированных малоновым диальдегидом и метилглиоксалем, и IgG, модифицированных малоновым диальдегидом и метилглиоксалем, с использованием моноклональных антител отечественного производства, которые показали более высокую информативность по сравнению с определением окисленных ЛНП и антител к ним стандартными наборами реактивов зарубежных производителей, что позволяет рекомендовать отечественные тест-системы при проведении научных исследований в дальнейшем. Учитывая более высокую физико-химическую стабильность и среднюю концентрацию в сыворотке крови молекул IgG, определение уровней IgG, модифицированных малоновым диальдегидом и метилглиоксалем можно использовать наряду с определением уровней ЛНП, модифицированных малоновым диальдегидом и метилглиоксалем для оценки процессов, связанных с альдегидной модификацией белков и липопротеинов.

Внедрение в практику полученных результатов

Результаты работы внедрены в научную и практическую работу ФГБУ «РКНПК» МЗ РФ.

Апробация диссертации

Материалы доложены на межотделенческой конференции НИИ кардиологии им. А.Л. Мясникова ФГБУ «РКНПК» МЗ РФ по апробации кандидатских диссертаций 21.07. 2015г., Протокол №25. Диссертация рекомендована к защите.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ. Основные положения работы были представлены на 17th triennial congress of the International Atherosclerosis Society, Amsterdam, may 2015 (постер № 828, 830)

и на III Международном образовательном форуме «Российские дни сердца», Москва, апрель 2015 (материалы форума).

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 123 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, результатов исследования и их обсуждения, выводов и практических рекомендаций, списка цитированной литературы, который содержит 109 источников. В работе приведены 57 таблиц и 55 рисунков.

Содержание работы

Материал и методы

В работу включено 93 мужчины в возрасте 28-70 лет: 70 больных, прошедших стационарное обследование и лечение в отделе проблем атеросклероза ИКК им А.Л. Мясникова в ФГБУ РКНПК в период с 2013 по 2014 год, 10 молодых практически здоровых добровольцев и 13 добровольцев старше 50 лет без клинических признаков ИБС. Всем мужчинам, включенным в исследование, проведено общеклиническое обследование (сбор анамнеза, физикальный осмотр, аускультация, измерение артериального давления, лабораторные анализы). Больным, проходившим стационарное лечение, также были выполнены следующие обследования: электрокардиограмма (ЭКГ) в 12 стандартных отведениях, эхокардиография (ЭХО КГ), дуплексное сканирование брахиоцефальных артерий, суточное мониторирование ЭКГ, тредмил-тест, коронароангиография (КАГ). Все пациенты, были информированы о возможных побочных эффектах и осложнениях проводимых процедур, участие в исследовании было добровольным. Все пациенты были разделены на 4 группы. **Группу 1** составили 50 больных с ангиографически документированным гемодинамически значимым (>50%) стенозированием коронарного русла (ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization, 2014). Средний возраст больных - 58,5 лет. **Группу 2** составили 20 больных с верифицированными при КАГ начальными атеросклеротическими поражениями КА. Средний возраст больных - 58,5 лет. В **группу 3** вошли 10 молодых практически здоровых добровольцев, средний возраст которых составил 29,5 лет. Основные сравнения проводились между первыми тремя группами. Принимая во внимание несопоставимость по возрасту основных сравниваемых групп, для исключения влияния возраста на результаты исследования была набрана **группа 4**, состоящая из 13 добровольцев старше 50

лет без клинических признаков ИБС, средний возраст которых – 58,0 лет. В таблицах 1 и 2 представлена клиническая характеристика и проводимая терапия пациентов, включённых в исследование.

Таблица 1. Клиническая характеристика пациентов, включённых в исследование (р - тест χ^2 , Kruskal-Wallis).

Показатель n (%)	Группа 1. Стенозирующий атеросклероз КА (n=50)	Группа 2. Нестенозирующий атеросклероз КА (n=20)	Группа 3. Молодые здоровые добровольцы (n=10)	Группа 4. Добровольцы старше 50 лет без ИБС (n=13)	Р
Возраст Me (LQ-UQ)	58,5 (51,0-65,0)	58,5 (47-68,5)	29,5 (28-30)	58,0 (52,0-64,0)	p1/3=0,00 p2/3=0,00 p4/3=0,0002
ИМТ Me (LQ-UQ)	30 (27-31)	28,5 (27,5-33,5)	23,5 (23-25)	23,0 (22-24)	p1/3=0,003 p1/4=0,00 p2/3=0,00 p2/4=0,0001
АГ	44 (88%)	17 (85%)	-	4 (31%)	p1/4=0,01 p2/4=0,03
ИМ	23 (46%)	2 (10%)	-	-	0,04
ОНМК	3 (6%)	-	-	-	
НРС	15 (30%)	10 (50%)	-	-	0,88
СД	13 (26%)	6 (30%)	-	-	0,66
Курение	36 (72%)	10 (50%)	-	5 (38%)	p1/4=0,04
Семейный анамнез	19 (38%)	8 (40%)	1(10%)	3 (23%)	p1/3=0,02 p2/3=0,04

Группы больных со стенозирующим и нестенозирующим атеросклерозом КА и добровольцев старше 50 лет были сопоставимы по возрасту. Сопутствующая АГ, перенесенные в анамнезе ИМ и ОНМК, курение чаще встречались у больных со стенозирующим атеросклерозом КА. ИМТ также был достоверно выше в данной группе пациентов. Группы больных со стенозирующим и нестенозирующим атеросклерозом КА были сопоставимы по сопутствующим НРС и СД, случаи отягощенного семейного анамнеза ССЗ также чаще встречались в данных группах.

Таблица 2. Проводимая терапия на момент включения в исследование (р - Kruskal-Wallis).

Терапия, n (%)	Группа 1. Стенозирующий атеросклероз КА (n=50)	Группа 2. Нестенозирующий атеросклероз КА (n=20)	Группа 4 Добровольцы старше 50 лет без ИБС (n=13)	Р
Пролонгированные нитраты	9 (18%)	1 (5%)	-	0,09
Бета-блокаторы	47 (94%)	16 (80%)	1(8%)	p1/4=0,00 p2/4=0,000 6
Антагонисты кальция	12 (24%)	5 (25%)	-	0,61
Ингибиторы АПФ / блокаторы рецепторов к ангиотензину II	38 (76%)	13 (65%)	4(31%)	p1/4=0,05
Диуретики	11 (22%)	8 (40%)	-	0,93
Аспирин	50 (100%)	20 (100%)	-	0,56
Клопидогрел	50 (100%)	20 (100%)	-	0,56
Статины	50 (100%)	15 (75%)	-	0,41

В таблице 2 представлена терапия, которую получали больные с гемодинамически значимым стенозированием КА, больные с начальными атеросклеротическими поражениями КА и добровольцы старше 50 лет без клинических признаков ИБС. Следует отметить, что последние не принимали гиполипидемической терапии, в отличие от больных с коронарным атеросклерозом, находившихся на терапии статинами. Забор крови осуществлялся в день проведения коронароангиографии (КАГ), в связи с чем, на момент забора крови больные первых двух групп находились на двойной дезагрегантной терапии – комбинации клопидогрела с ацетилсалициловой кислотой (АСК), которая в последующем была продолжена или прекращена, в зависимости от результатов КАГ. Молодые практически здоровые добровольцы медикаментозной терапии не получали.

Методы

В биохимическом анализе крови определяли уровень общего холестерина (ХС), триглицеридов (ТГ), холестерина липопротеидов низкой плотности (ХС ЛНП), холестерина липопротеидов высокой плотности (ХС ЛВП),

высококчувствительного С-реактивного белка (вчСРБ), интерлейкина 6 (ИЛ-6). В сыворотке крови методом твердофазного хемилюминесцентного иммуноферментного анализа (ИФА) определяли уровень сывороточных антител классов Ig G/A/M суммарно к β 2ГП1, антител классов Ig G/A/M суммарно к человеческому HSP60. Основным этапом работы было определение уровня окисленных липопротеидов низкой плотности и антител к ним. Количественное определение проводилось методом ИФА с использованием наборов реактивов MDA-oxLDL и OLAB IgG фирмы «Biomedica» (Австрия). В лаборатории иммунохимии ИЭК (руководитель – к.б.н. Е.Е. Ефремов) методом твердофазного ИФА с использованием моноклональных антител, предоставленных лабораторией клеточной инженерии ИЭК (руководитель – к.б.н. Т.Н. Власик) проводилось качественное определение следующих показателей:

- Аутоантитела к ЛНП человека (ААТ-ЛНП);
- ЛНП человека, модифицированные малоновым диальдегидом (МДА-ЛНП);
- ЛНП человека, модифицированные метилглиоксалем (МГ-ЛНП);
- IgG человека, модифицированные малоновым диальдегидом (МДА-IgG);
- IgG человека, модифицированные метилглиоксалем (МГ- IgG);
- Моно-СРБ - мономерный С-реактивный белок.

Всем больным с коронарным атеросклерозом (n=70) по показаниям проводилась КАГ. Процедуру выполняли в лаборатории рентген-эндоваскулярных методов лечения (руководитель д.м.н., проф. Самко А.Н.) НИИ Кардиологии им А. Л. Мясникова ФГУ РКНПК МЗ РФ с использованием рентгенангиографического аппарата фирмы «SIEMENS» (Германия) с цифровой обработкой и регистрацией на жесткий диск рентгеновского изображения.

Статистическая обработка

Математическая обработка полученных результатов проводилась с использованием пакета статистического анализа данных Statistica 6. При создании базы данных использовался редактор электронных таблиц Microsoft Office Excel 2007. Количественные переменные представлены в виде Медиана (межквартильный размах). Для определения статистической значимости различий количественных признаков при попарном межгрупповом сравнении применяли U-критерий по методу Mann-Whitney, для множественного межгруппового сравнения использовали тест медиан и критерий Kruskal-Wallis. Для сопоставления групп по качественным признакам применяли метод χ^2 ,

точный критерий Фишера. Различия считались статистически достоверными при $p < 0.05$.

Исследуемые показатели имели непараметрическое распределение, поэтому для оценки взаимосвязи количественных признаков использовался метод ранговой корреляции по Spearman. Считалось, что корреляция имеется при $p < 0.05$. Сила корреляции оценивалась согласно соотношению Чеддока: при r от 0.1 до 0.3 корреляция считалась слабой, при r от 0.3 до 0.5 - умеренной, при r от 0.5 до 0.7 – заметной, свыше 0,7 - тесной.

Результаты исследования и их обсуждение

Сравнение показателей липидного профиля у пациентов различных групп

При множественном межгрупповом сравнении показателей липидного профиля с использованием теста Kruskal-Wallis в группе молодых практически здоровых добровольцев были выявлены достоверно более низкие значения ХС ($p=0,001$) и ЛНП ($p=0,002$) (таблица 3).

Таблица 3. Сравнение показателей липидного профиля пациентов, включенных в исследование (p - Kruskal-Wallis).

Показатель ммоль/л	Группа 1. Стенозирующий атеросклероз КА (n=50)	Группа 2. Нестенозирующий атеросклероз КА (n=20)	Группа 3. Молодые здоровые добровольцы (n=10)	Группа 4. Добровольцы старше 50 лет без ИБС (n=13)	P
ХС	4,67 (3,95-5,95)	5,24 (4,88-6,46)	4,12 (3,32-4,99)	5,68 (5,31-6,21)	0,001
ТГ	1,57 (1,28-2,30)	1,82 (1,33-2,36)	1,30 (0,98-1,64)	1,31 (0,84-1,73)	0,58
ЛВП	0,95 (0,88-1,04)	1,04 (0,95-1,22)	1,13 (0,90-1,54)	1,43 (0,95-1,62)	0,004
ЛНП	2,93 (2,36-3,85)	3,34 (2,87-4,37)	2,27 (1,83-2,73)	3,78 (3,46-4,25)	0,002

При дальнейшем попарном сравнении групп по методу Mann-Whitney в группе с нестенозирующим атеросклерозом КА выявлен более высокий уровень ХС ($p=0,03$) и ЛВП ($p=0,02$) чем у больных со стенозирующим атеросклерозом КА. У добровольцев старше 50 лет без клинических признаков ИБС, не принимающих статины, уровень ХС ($p=0,005$), ЛВП (0,01), ЛНП ($p=0,02$) был выше, чем у больных со стенозирующим атеросклерозом КА

находящихся на гиполипидемической терапии статинами. Показатели липидного профиля у больных с нестенозирующим атеросклерозом КА и добровольцев старше 50 лет без клинических признаков ИБС достоверно не различались.

Пациенты из группы молодых практически здоровых добровольцев и добровольцы старше 50 лет без клинических признаков ИБС не принимали гиполипидемической терапии, однако не были сопоставимы по возрасту. При сравнении показателей липидного профиля в этих группах, отмечался более высокий уровень ХС (0,0002) и ЛНП (0,0002) в группе добровольцев старше 50 лет без клинических признаков ИБС. При объединении всех больных с коронарным атеросклерозом в одну группу и сравнении с группой молодых практически здоровых добровольцев, у больных с коронарным атеросклерозом уровень ХС (0,02), ТГ (0,05), ЛНП (0,01) был достоверно выше.

Таким образом, в сравниваемых группах имелись достоверные различия показателей липидного профиля. Следует отметить, что при сравнении групп больных с различной степенью атеросклеротического поражения КА в группе с нестенозирующим атеросклерозом КА выявлены более высокий уровень ХС и ЛВП чем у больных со стенозирующим атеросклерозом КА.

Сравнение маркеров воспаления у пациентов различных групп

Как видно из таблицы 4, при сравнении уровня маркеров воспаления статистически значимых различий уровня вчСРБ и ИЛ-6 у больных с различной степенью поражения КА не было. Но значения данных показателей были достоверно выше у больных с коронарным атеросклерозом, чем у молодых практически здоровых лиц.

Таблица 4. Сравнение уровня маркеров воспаления у больных с различной степенью поражения КА и молодых практически здоровых лиц (p - Kruskal-Wallis).

	Группа 1. Стенозирующий атеросклероз КА (n=50)	Группа 2. Нестенозирующий атеросклероз КА (n=20)	Группа 3. Молодые здоровые добровольцы (n=10)	P
вчСРБ, мг/л	2,15 (1,08-4,55)	1,74 (0,63-5,12)	0,83 (0,44-1,50)	0,05
ИЛ-6, пг/мл	3,00 (2,00-4,00)	3,00 (2,00-4,00)	1,00 (1,00-1,00)	0,04

Сравнение уровня ОкЛНП и Ат-ОкЛНП у пациентов различных групп

Основным этапом работы было определение и сравнение уровня сывороточных ОкЛНП и Ат-ОкЛНП у пациентов с различной степенью атеросклеротического поражения коронарного русла и практически здоровых лиц.

В таблице 5 представлены уровни ОкЛНП у пациентов с различной степенью поражения КА и добровольцев различных возрастных групп. Анализ данных продемонстрировал отсутствие статистически значимых различий уровня ОкЛНП между группами.

Таблица 5. Уровень ОкЛНП у пациентов различных групп (p - Kruskal-Wallis).

	Группа 1. Стенозирующий атеросклероз КА (n=50)	Группа 2. Нестенозирующий атеросклероз КА (n=20)	Группа 3. Молодые здоровые добровольцы (n=10)	Группа 4. Добровольцы старше 50 лет без ИБС (n=13)	P
ОкЛНП, мкг/мл	0.84 (0.01-2.56)	0.87 (0.11-3.97)	1.19 (0,47-5,57)	1.04 (0.01-1.61)	0,54

Несмотря на то, что между группами больных с различной степенью поражения коронарного русла, группой молодых условно здоровых добровольцев и добровольцев старше 50 лет без клинических признаков ИБС имелись достоверные различия показателей липидного профиля и основных воспалительных биомаркеров атеросклероза, статистически значимых различий уровня ОкЛНП получено не было. Этот факт может быть объяснён тем, что окислительная модификация ЛНП в основном происходит в субэндотелиальном пространстве артериальной стенки [Steinberg D, et al., 1989]. В связи с чем, существует вероятность того, что находящиеся в субэндотелии ОкЛНП просто не выявляются в общей циркуляции. Ранее сообщалось, что *in vivo* в кровотоке циркулируют ОкЛНП различной степени окисленности и разным соотношением первичных и вторичных продуктов окисления [Ланкин В.З. и соавт., 2008]. Возможно, данный факт также может затруднять определение ОкЛНП наборами реактивов, фиксированными на выявлении определённой формы окислительно модифицированных ЛНП. Не исключается и вероятность того, что при образовании иммунных комплексов ОкЛНП с Ат-ОкЛНП, концентрация обоих показателей не может быть достоверно определена стандартными наборами реактивов, очевидно, что необходима дополнительная оценка содержания и самих иммунных комплексов.

Сравнение уровня ОкЛНП в сопоставимых по возрасту группах больных со стенозирующим и нестенозирующим атеросклерозом КА, находящихся на гиполипидемической терапии статинами, и добровольцев старше 50 лет, не принимающих статины, достоверных различий данного показателя также не выявило. Что в свою очередь может говорить об отсутствии влияния терапии статинами на уровень ОкЛНП.

В таблице 6 представлены данные множественного межгруппового сравнения уровня АТ-ОкЛНП у пациентов первых трех групп. При проведении дальнейшего попарного межгруппового сравнения статистически значимых различий уровня АТ-ОкЛНП у больных со стенозирующим и нестенозирующим коронарным атеросклерозом выявлено не было ($p=0,22$). Уровень АТ-ОкЛНП у больных с нестенозирующим коронарным атеросклерозом и молодых практически здоровых добровольцев также достоверно не различался ($p=0,28$). Однако, в группе молодых практически здоровых добровольцев уровень АТ-ОкЛНП были достоверно выше по сравнению с показателями группы больных со стенозирующим атеросклерозом КА (таблица 7).

Таблица 6. Уровень АТ-ОкЛНП у пациентов различных групп (p - Kruskal-Wallis).

	Группа 1. Стенозирующий атеросклероз КА (n=50)	Группа 2. Нестенозирующий атеросклероз КА (n=20)	Группа 3. Молодые здоровые добровольцы (n=10)	P
АТ-ОкЛНП мЕ/мл	146.92 (83.92-278.55)	203.53 (111.72-352.43)	268.65 (170.53-897.56)	0,14

Таблица 7. Уровень АТ-ОкЛНП у больных со стенозирующим атеросклерозом КА и молодых практически здоровых добровольцев (p - Mann-Whitney).

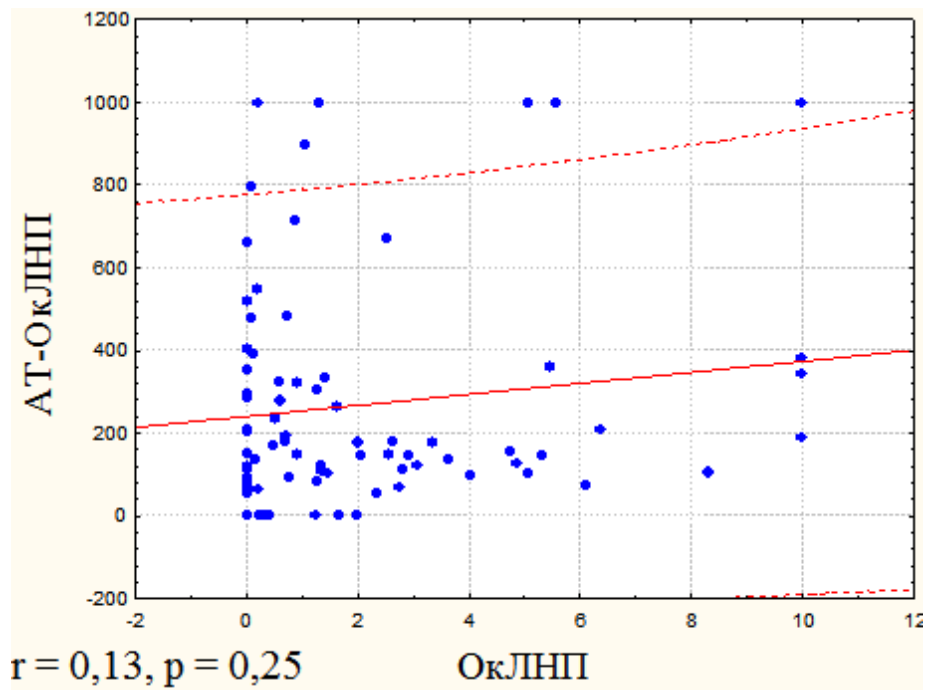
	Группа 1. Стенозирующий атеросклероз КА (n=50)	Группа 3. Молодые здоровые добровольцы (n=10)	P
АТ-ОкЛНП мЕ/мл	146.92 (83.92-278.55)	268.65 (170.53-897.56)	0,03

Вероятно, что более высокий уровень АТ-ОкЛНП у молодых практически здоровых добровольцев может быть обусловлен их иммунным статусом. То есть, активность иммунных процессов у лиц старшего возраста, страдающих ИБС, ниже, чем у молодых практически здоровых людей. Такая точка зрения базируется на том, что с возрастом происходит инволюция лимфоидной ткани, ее замещение соединительной и жировой тканями, что сопровождается нарушением иммунокомпетентности а также снижением гуморального и клеточного иммунного ответа на чужеродные антигены [Fabris N, et al., 1991]. Особенности возрастной динамики показателей иммунного статуса заключаются прежде всего в уменьшении общего числа Т- и В-лимфоцитов, изменении соотношения Т-хелперов и Т-супрессоров. Пролиферативная активность лимфоцитов при их стимуляции антигенами снижается, нарушается экспрессия рецепторов, отвечающих за межклеточные взаимодействия. Меняется уровень продукции цитокинов и сывороточных иммуноглобулинов [Ennist DL, et al., 1986].

Однако, как и в случае с ОкЛНП, есть вероятность того, что аутоантитела в составе иммунных комплексов не могут быть выявлены использованными нами наборами реактивов. Что ещё раз доказывает необходимость оценки содержания в сыворотке крови иммунных комплексов ОкЛНП с АТ-ОкЛНП. Известно, что усиленный захват иммунных комплексов макрофагами в артериальной стенке способствует прогрессированию атеросклероза. В то же время, удаление данных комплексов из общей циркуляции клетками Купфера в печени носит атеропротективный характер. Что может свидетельствовать о том, что роль АТ-ОкЛНП в атерогенезе зависит и от пути элиминации иммунных комплексов ОкЛНП с АТ-ОкЛНП.

При проведении корреляционного анализа взаимосвязи между уровнем ОкЛНП и уровнем АТ-ОкЛНП нами установлено не было (рисунок 1), хотя в литературе имеются данные, свидетельствующие об обратной зависимости между уровнем ОкЛНП и титрами АТ-ОкЛНП [Shoji T, et al., 2000].

Рисунок 1. Корреляционная связь между уровнем ОкЛНП и АТ-ОкЛНП у пациентов первых трех групп (n=80).



Обращает на себя внимание отсутствие корреляционной связи между уровнем ОкЛНП и показателями липидного профиля: ХС ($r = 0,01, p = 0,95$), ТГ ($r = -0,18, p = 0,10$), ЛВП ($r = 0,05, p = 0,68$), ЛНП ($r = 0,04, p = 0,74$) (рисунок 2). Корреляционной связи между уровнем ОкЛНП и АТ-ОкЛНП и такими факторами риска как курение, возраст, ИМТ также выявлено не было.

Рисунок 2. Корреляционная связь между уровнем ОкЛНП и показателями липидного профиля у пациентов первых трех групп (n=80).

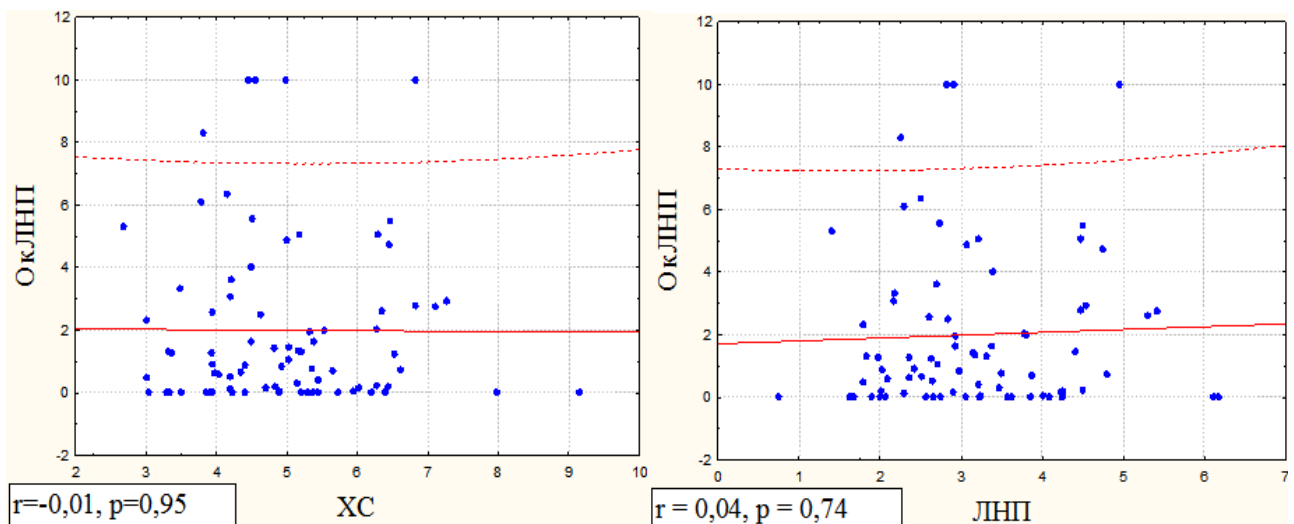
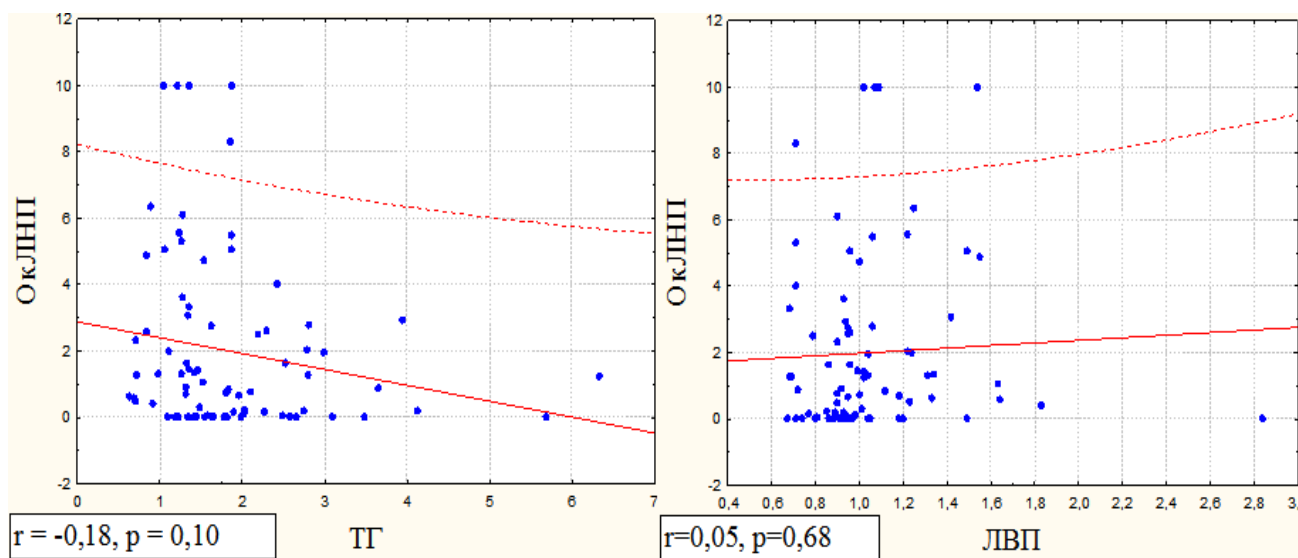


Рисунок 2. Продолжение.



Аналогично, между уровнем АТ-ОкЛНП и показателями липидного профиля достоверной корреляционной связи не отмечалось: ХС ($r = 0,06$, $p = 0,57$), ТГ ($r = -0,08$, $p = 0,45$), ЛВП ($r = 0,03$, $p = 0,81$), ЛНП ($r = 0,08$, $p = 0,47$) (рисунок 3).

Рисунок 3. Корреляционная связь между уровнем АТ-ОкЛНП и показателями липидного профиля у пациентов первых трех групп (n=80).

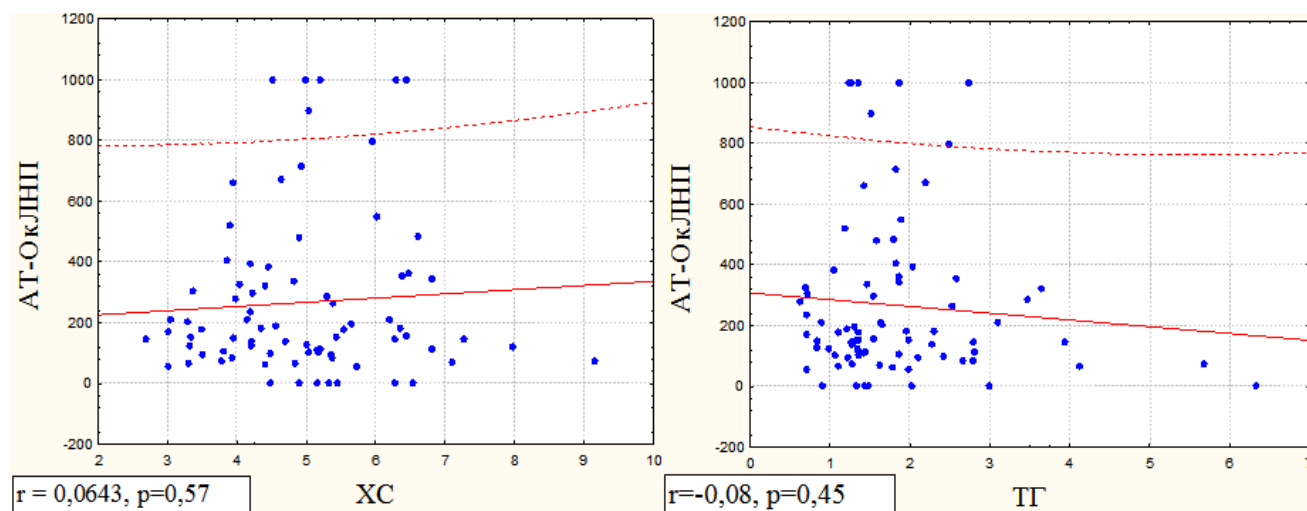
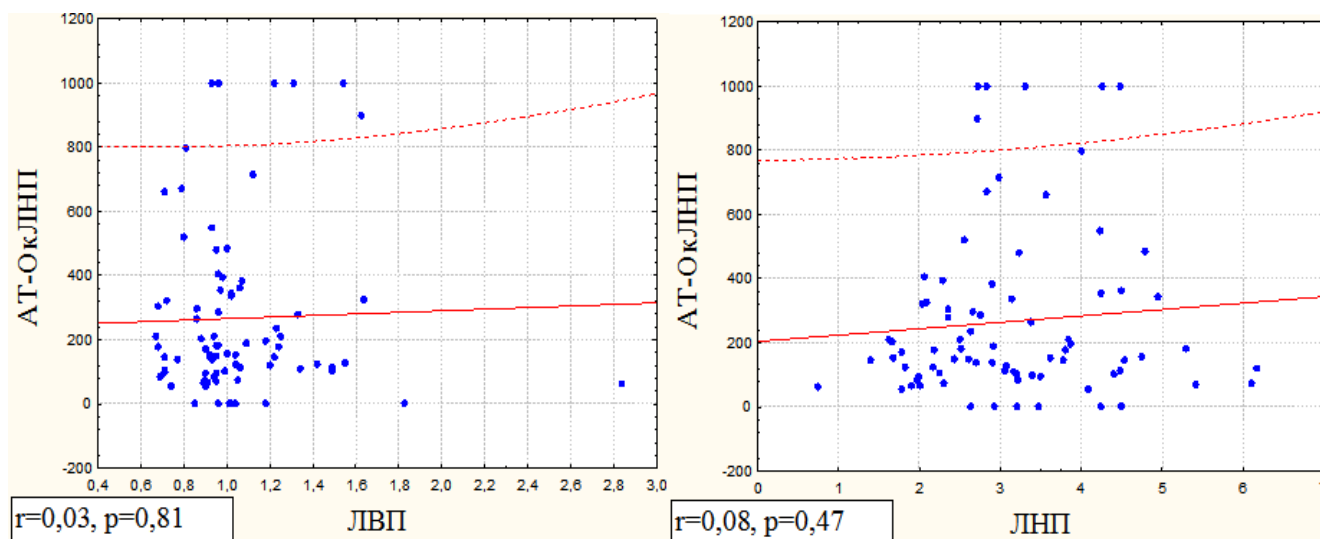
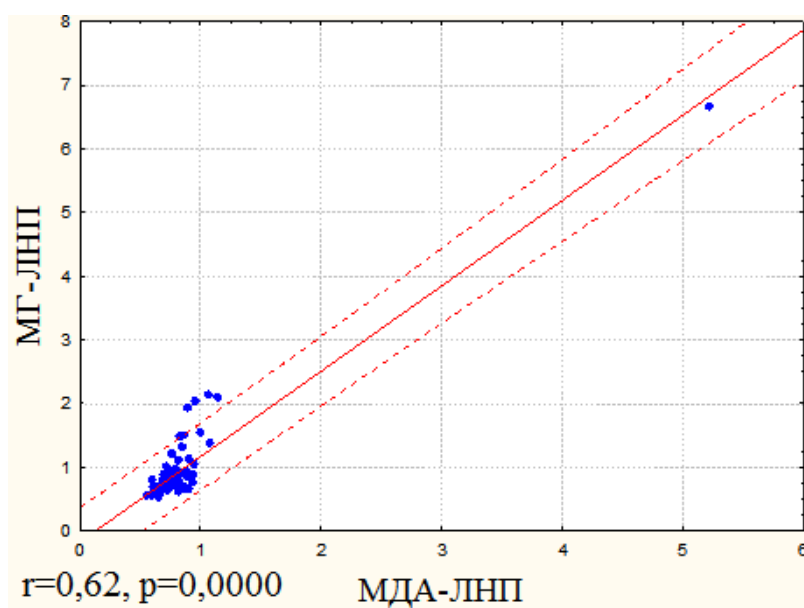


Рисунок 3. Продолжение.



Корреляционный анализ продемонстрировал отсутствие ассоциации между уровнем ОкЛНП и уровнем ЛНП, модифицированных малоновым диальдегидом и метилглиоксалем (МДА-ЛНП и МГ-ЛНП). Однако, была установлена корреляция между уровнем МДА-ЛНП и уровнем МГ-ЛНП ($r=0,62$, $p=0,0000$) (рисунок 4), что может отражать однонаправленность процессов окислительной модификации липопротеидов малоновым диальдегидом и метилглиоксалем.

Рисунок 4. Корреляционная связь между уровнем МДА-ЛНП и уровнем МГ-ЛНП у пациентов первых трех групп (n=80).



Сравнение уровней МДА-IgG и МГ-IgG у пациентов различных групп.

Анализ данных продемонстрировал, что статистически значимых различий уровня МДА-IgG и МГ-IgG у больных со стенозирующим и нестенозирующим атеросклерозом КА не было. При сравнении больных со стенозирующим атеросклерозом КА и молодых практически здоровых добровольцев уровень обоих показателей был достоверно выше в группе молодых условно здоровых добровольцев (таблица 8). В группе молодых практически здоровых добровольцев уровень МДА-IgG и МГ-IgG аналогично был достоверно выше, чем у больных с нестенозирующим атеросклерозом КА (таблица 9). Полученные данные подтверждают мнение о том, что иммунный статус и скорость метаболических процессов пациентов могут влиять и на содержание сывороточных МДА-IgG и МГ-IgG.

Таблица 8. Уровень МДА-IgG и МГ-IgG у больных со стенозирующим атеросклерозом КА и молодых практически здоровых добровольцев (p - Mann-Whitney).

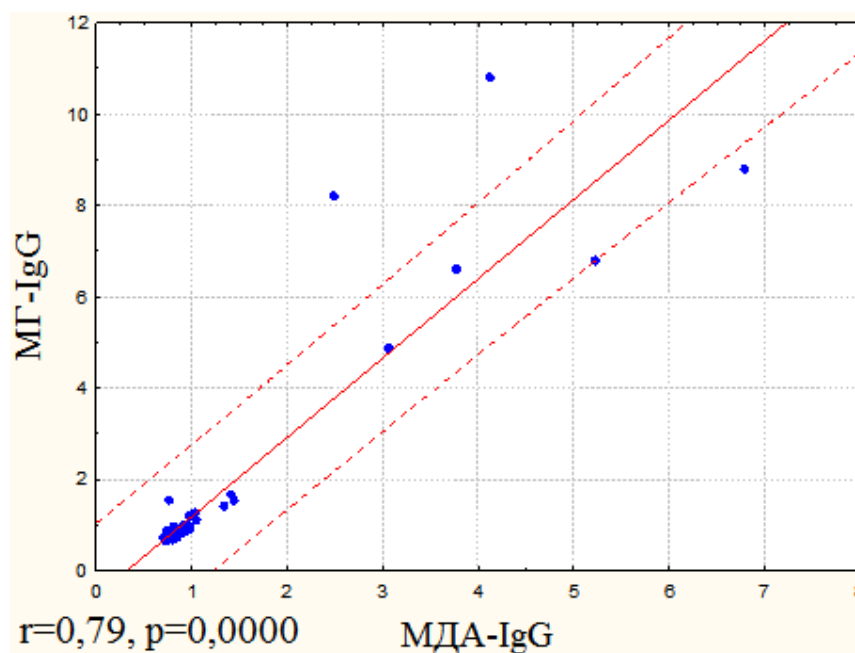
Показатель	Стенозирующий атеросклероз КА (n=50)	Молодые здоровые добровольцы (n=10)	P
МДА-IgG, R	0,82 (0,76-0,89)	0,92 (0,84-3,07)	0,02
МГ-IgG, R	0,83 (0,75-0,89)	1,21 (0,86-4,86)	0,01

Таблица 9. Уровень МДА-IgG и МГ-IgG у больных с нестенозирующим атеросклерозом КА и молодых практически здоровых добровольцев (p - Mann-Whitney).

Показатель	Нестенозирующий атеросклероз КА (n=20)	Молодые здоровые добровольцы (n=10)	P
МДА-IgG, R	0,88 (0,82-0,97)	0,92 (0,84-3,07)	0,02
МГ-IgG, R	0,87 (0,81-0,94)	1,21 (0,86-4,86)	0,01

При проведении корреляционного анализа нами выявлена корреляционная связь ($r=0,79$, $p=0,0000$) между уровнем МДА-IgG и МГ-IgG (рисунок 5).

Рисунок 5. Корреляционная связь между уровнем МДА-IgG и МГ-IgG у пациентов первых трех групп (n=80).



Обращает на себя внимание наличие умеренной корреляционной связи между уровнями МДА-ЛНП, МГ-ЛНП и уровнем МДА-IgG, МГ-IgG (таблица 10).

Таблица 10. Корреляционная связь между уровнем МДА-ЛНП, МГ-ЛНП и уровнем МДА-IgG, МГ-IgG у пациентов первых трех групп (n=80).

Показатель	r (по Spearman)	p
МДА-ЛНП и МДА-IgG	0,44	0,00004
МДА-ЛНП и МГ-IgG	0,38	0,0005
МГ-ЛНП и МДА-IgG	0,49	0,000004
МГ-ЛНП и МГ-IgG	0,42	0,0001

Сотрудниками лаборатории иммунохимии ИЭК РКНПК (руководитель – к.б.н. Е.Е. Ефремов) высказывается мнение, что высокая лабильность молекулы ЛНП затрудняет её использование в качестве стандарта для иммуноферментных диагностикумов, в качестве более удобных объектов

исследования предлагаются IgG. Известно, что молекулы сывороточных белков, таких как IgG, имеют большую физико-химическую стабильность, а их средняя концентрация в сыворотке крови на порядок выше, чем концентрация апоВ. В связи с чем, наряду с уже ставшим классическим методом определения модифицированных ЛНП, предлагается разработка тестов для определения IgG. Нам такое предложение кажется целесообразным, так как в нашем исследовании была выявлена достоверная умеренная корреляции между уровнями МДА-ЛНП, МГ-ЛНП и уровнями МДА-IgG, МГ-IgG. То есть при наличии трудностей с определением содержания модифицированных ЛНП, не исключается возможность определения IgG в качестве альтернативного метода оценки процессов альдегидной модификации белков.

Сравнение уровней Ат-HSP60 и Ат-β2ГП3 у пациентов различных групп

Определение и сравнение содержания Ат-β2ГП3 и Ат-HSP60 оказалось малоинформативным, так как при сравнении полученных результатов статистически значимых различий между группами больных с различной степенью поражения коронарного русла и молодыми практически здоровыми добровольцами выявлено не было (таблица 11). Поэтому, следует признать, что изучение роли данных показателей в развитии атеросклеротического процесса требует дальнейших исследований.

Таблица 11. Сравнение уровня Ат-HSP60 и Ат-β2ГП3 у больных со стенозирующим и нестенозирующим атеросклерозом КА и молодых практически здоровых добровольцев (p - Kruskal-Wallis).

	Группа 1. Стенозирующий атеросклероз КА (n=50)	Группа 2. Нестенозирующий атеросклероз КА (n=20)	Группа 3. Молодые здоровые добровольцы (n=10)	P
Ат-HSP60 нг/мл	18771 (10844-38340)	18050,5 (12119-25312,5)	2714 (13726-39116)	0,30
Ат-β2ГП3 Е/мл	3,92 (3,44-4,80)	4,20 (1,70-5,93)	3,47 (0,5-3,80)	0,11

Таким образом, можно заключить, что содержание сывороточных ОкЛНП и Ат-ОкЛНП не всегда зависит от уровня традиционных показателей

липидного профиля. Взаимосвязь между самими ОкЛНП и антителами к ним также может не прослеживаться. На выявление данных показателей может влиять ряд факторов, таких как степень окисления ЛНП, протекание процесса модификации ЛНП преимущественно в субэндотелиальном русле, нахождение ОкЛНП и АТ-ОкЛНП в связанном состоянии в виде иммунных комплексов, пути элиминации данных иммунных комплексов и иммунный статус пациентов.

Выводы:

- 1.** У больных со стенозирующим и нестенозирующим атеросклерозом коронарных артерий, у добровольцев старше 50 лет без клинических признаков ИБС и молодых практически здоровых добровольцев статистически значимых различий в уровне сывороточных окисленных ЛНП не выявлено.
- 2.** Установлена тесная корреляционная связь между уровнями ЛНП, модифицированных малоновым диальдегидом, и ЛНП, модифицированных метилглиоксалем, при отсутствии взаимосвязи с показателями окисленных ЛНП.
- 3.** Взаимосвязи между уровнем окисленных ЛНП и уровнем антител к окисленным ЛНП не выявлено.
- 4.** Уровень антител к окисленным ЛНП у больных со стенозирующим и нестенозирующим атеросклерозом коронарных артерий достоверно не различался, в то время как у молодых практически здоровых добровольцев уровень антител к окисленным ЛНП был достоверно выше, чем у больных со стенозирующим атеросклерозом коронарных артерий.
- 5.** У молодых практически здоровых добровольцев выявлен достоверно более высокий уровень IgG, модифицированных малоновым диальдегидом и метилглиоксалем, чем у больных со стенозирующим и нестенозирующим атеросклерозом коронарных артерий, при этом отмечена тесная корреляционная связь между уровнями IgG, модифицированных малоновым диальдегидом и метилглиоксалем.
- 6.** Связи между уровнями окисленных ЛНП и антител к ним с показателями липидного профиля, маркерами воспаления и основными факторами риска ССЗ у больных с коронарным атеросклерозом и молодых практически здоровых лиц не выявлено, несмотря на то, что уровни вЧСРБ, ИЛ-6, общего холестерина, ЛНП и триглицеридов были достоверно выше у больных с коронарным атеросклерозом.
- 7.** Уровень окисленных ЛНП у сопоставимых по возрасту больных со стенозирующим и нестенозирующим атеросклерозом КА, находящихся на гиполипидемической терапии статинами, и добровольцев старше 50 лет, не принимающих статины, достоверно не различался.
- 8.** У больных со стенозирующим и нестенозирующим атеросклерозом коронарных артерий и молодых практически здоровых добровольцев статистически значимых различий в уровне антител к β 2-гликопротеину I и антител к белку теплового шока 60 не выявлено.

Практические рекомендации:

- 1.** Окисленные ЛНП, ЛНП, модифицированные малоновым диальдегидом, и ЛНП, модифицированные метилглиоксалем, в отличие от показателей ХС, ХС ЛНП, ХС ЛВП, не отражают степень нарушений липидного обмена в изученной выборке пациентов.
- 2.** Следует учитывать, что у больных ИБС с различной степенью атеросклеротического поражения коронарных артерий уровень антител к окисленным ЛНП и уровень IgG, модифицированных малоновым диальдегидом и метилглиоксалем, достоверно ниже чем у молодых практически здоровых лиц.
- 3.** Применение статинов у больных со стенозирующим и нестенозирующим атеросклерозом коронарных артерий не влияет на уровень окисленных ЛНП и антител к ним.
- 4.** Наряду с определением уровней ЛНП, модифицированных малоновым диальдегидом и метилглиоксалем, для изучения процессов альдегидных модификаций белков может быть использовано определение уровней IgG, модифицированных малоновым диальдегидом и метилглиоксалем.
- 5.** Разработанные и апробированные в лаборатории иммунохимии ИЭК РКНПК методы определения ЛНП, модифицированных малоновым диальдегидом и метилглиоксалем, и IgG, модифицированных малоновым диальдегидом и метилглиоксалем, могут быть использованы в качестве альтернативы определения окисленных ЛНП и антител к ним стандартными наборами реактивов зарубежных производителей.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Карпов А.А., Рвачева А.В., Шогенова М.Х., Жетишева Р.А., Масенко В.П., Наумов В.Г. Современные представления об иммуно-воспалительных механизмах атеросклероза. Атеросклероз и дислипидемии, 2014, №1, стр. 25-31.
2. Шогенова М.Х., Жетишева Р.А., Карпов А.М., Доценко Ю.В., Масенко В.П., Наумов В.Г. Роль окисленных липопротеинов низкой плотности и антител к ним в иммунно-воспалительном процессе при атеросклерозе. Атеросклероз и дислипидемии, 2015, №2, стр. 17-21.
3. Шогенова М.Х., Жетишева Р.А., Карпов А.М., Масенко В.П., Наумов В.Г. Окисленные липопротеиды низкой плотности и антитела к ним у больных ИБС с коронарным атеросклерозом и здоровых лиц. Атеросклероз и дислипидемии, 2015, №3, стр. 56-60.
4. Шогенова М.Х., Жетишева Р.А., Карпов А.М., Масенко В.П., Наумов В.Г. Уровни окисленных липопротеинов низкой плотности, показатели липидного профиля и маркеры воспаления у больных с коронарным атеросклерозом и здоровых лиц. Материалы III Международного образовательного форума «Российские дни сердца». Российский кардиологический журнал, 2015; 4(120), приложение 1, стр. 111
5. Шогенова М.Х., Жетишева Р.А., Карпов А.М., Масенко В.П., Наумов В.Г. Связь уровня аутоантител к окисленным липопротеинам низкой плотности с тяжестью коронарного атеросклероза. Материалы III Международного образовательного форума «Российские дни сердца». Российский кардиологический журнал, 2015; 4(120), приложение 1, стр. 111
6. Shogenova M.H., Zhetisheva R.A., Karpov A.M., Masenko V.P., Naumov V.G. Oxidized low density lipoproteins in patients with coronary atherosclerosis and healthy volunteers. 17th International symposium on atherosclerosis. May 2015. Poster № 830.
7. Shogenova M.H., Zhetisheva R.A., Karpov A.M., Masenko V.P., Naumov V.G. Autoantibodies against oxidized low-density lipoproteins: relationship with the severity of coronary atherosclerosis. 17th International symposium on atherosclerosis. May 2015. Poster № 828.

Список сокращений

HSP - белок теплового шока
 β 2ГП - β 2-гликопротеин I
ААТ-ЛНП - аутоантитела к ЛНП человека
АГ - артериальная гипертония
АпоВ - апопротеин В
АСК - ацетилсалициловая кислота
Ат-HSP60 - антитела к белку теплового шока 60
Ат- β 2ГП - антитела к β 2-гликопротеину I
Ат-окЛНП - антитела к окисленным липопротеидам низкой плотности
ВОЗ - Всемирная организация здравоохранения
ВчСРБ - высокочувствительный С-реактивный белок
ИАПФ - ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента
ИБС - ишемическая болезнь сердца
ИЛ-6 - интерлейкин 6
ИМ - инфаркт миокарда
ИМТ - индекс массы тела
ИФА - иммуноферментный анализ
КА - коронарные артерии
КАГ - коронароангиография
ЛВП - липопротеиды высокой плотности
ЛНП - липопротеиды низкой плотности
МГ-IgG - IgG человека, модифицированные метилглиоксалем
МГ-ЛНП - ЛНП человека, модифицированные метилглиоксалем
МДА-IgG - IgG человека, модифицированные малоновым диальдегидом
МДА-ЛНП - ЛНП человека, модифицированные малоновым диальдегидом
МИ - мозговой инсульт
Моно-СРБ - мономерный С-реактивный белок
НРС - нарушение ритма сердца
ОкЛНП - окисленные липопротеиды низкой плотности
ОНМК - острое нарушение мозгового кровообращения
СД-сахарный диабет
ССЗ - сердечно-сосудистые заболевания
ТГ - триглицериды
ХС - общий холестерин
ЭКГ – электрокардиограмма
ЭХОКГ - эхокардиография