

Нарушения липидного обмена, активность параоксоназы 1 и полиморфизм L55M и Q192R в гене параоксоназы 1 у больных ишемической болезнью сердца

А.Н. Войтович¹, М.А. Богданова¹, Б.И. Смирнов², М.И. Бадмаева³, Г.Д. Пардо Пералес⁴,
С.А. Бойцов⁵, Н.В. Кириллова⁴, О.А. Беркович³, Е.В. Шляхто³, В.И. Ларионова¹

¹ Государственное образовательное учреждение профессионального высшего образования «Санкт-Петербургская государственная педиатрическая медицинская академия» Федерального Агентства по здравоохранению и социальному развитию, Санкт-Петербург, Россия

² Государственное образовательное учреждение профессионального высшего образования «Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет» «ЛЭТИ» им. В.И. Ульянова/Ленина/» Федерального Агентства по образованию, Санкт-Петербург, Россия

³ Государственное образовательное учреждение профессионального высшего образования «Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Федерального Агентства по здравоохранению и социальному развитию, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Государственное образовательное учреждение профессионального высшего образования «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Федерального Агентства по здравоохранению и социальному развитию, Санкт-Петербург, Россия

⁵ Российский кардиологический центр РКНПК МЗ РФ, Москва, Россия

Войтович А.Н. — научный сотрудник, магистр биологии; Богданова М.А. — научный сотрудник, магистр биологии; Смирнов Б.И. — доцент, кандидат технических наук; Бадмаева М.И. — ассистент, кандидат медицинских наук; Пардо-Пералес Г.Д. — кандидат биологических наук; Бойцов С.А. — первый заместитель генерального директора Российского кардиологического научно-производственного комплекса Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, доктор медицинских наук, профессор; Кириллова Н.В. — заведующий кафедрой биохимии, доктор биологических наук, профессор; Беркович О.А. — доктор медицинских наук, профессор; Шляхто Е.В. — заведующий кафедрой факультетской терапии Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова, директор ФГУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова Росмедтехнологий», доктор медицинских наук, профессор, чл.-корр. РАМН; Ларионова В.И. — заведующая лабораторией, доктор медицинских наук.

Контактная информация: Литовская ул., д. 2, Санкт-Петербург, Россия, 194100. Тел.: 8 (812) 295-10-71. E-mail: anna_voitovich@yahoo.com (Войтович Анна).

Резюме

Цель исследования — анализ антиатерогенной роли фермента параоксоназы 1, исследование гидролитической активности PON1 в сопоставлении со структурными особенностями кодирующего ее гена *PON1*, липидными и липопротеиновыми показателями крови и показателями перекисного окисления липидов. **Материалы и методы.** Обследовано 227 мужчин (средний возраст $46,9 \pm 0,5$ года), больных ишемической болезнью сердца (ИБС), перенесших инфаркт миокарда (ИМ) в возрасте до 45 лет, и 114 мужчин без признаков патологии сердечно-сосудистой системы в возрасте от 28 до 56 лет (средний возраст $40,0 \pm 0,5$ года). У всех пациентов определяли концентрации общего холестерина (ОХС), холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП), триглицеридов (ТГ) в сыворотке крови, а также измерили гидролитическую активность PON1 с использованием в качестве субстрата фенилацетата. Уровень перекисного окисления липидов оценивали по содержанию малонового диальдегида (МДА). Полиморфизм L55M и Q192R гена *PON1* определяли методом полиморфизма длины рестриционных фрагментов (ПДРФ). **Результаты.** У больных, перенесших ИМ в возрасте до 45 лет, уровни ОХС и ТГ оказались достоверно выше ($p = 0,024$ и $p < 0,001$ соответственно), а ХС ЛПВП — достоверно ниже ($p < 0,001$), по сравнению с показателями у здоровых мужчин. Уровни МДА в плазме крови и в эритроцитах больных, перенесших ИМ, были достоверно выше, чем уровни аналогичного показателя у здоровых мужчин ($p < 0,001$), и находились в прямой корреляции с уровнями ОХС и ТГ ($p = 0,01$ и $p < 0,001$ соответственно). В то же время уровни активности PON1 у больных были снижены, по сравнению с показателями у здоровых мужчин ($p < 0,001$), и находились в прямой корреляции с уровнями ХС ЛПВП ($p = 0,05$). При этом активность параоксоназы 1 была достоверно ниже у больных ИБС-носителей аллеля 192R по гену *PON1*, по сравнению с этим показателем у гомозиготных носителей аллеля Q192 ($p = 0,012$). **Выводы.** Исследование активности PON1 у больных ИБС, наряду с факторами риска атеросклероза, влияющими на нее, таких как окислительный стресс, атерогенный липидный профиль сыворотки крови и генетический полиморфизм, важно для дифференцированного подхода к диагностике и лечению ИБС.

Ключевые слова: ишемическая болезнь сердца, параоксоназа 1, генетический полиморфизм.

Atherogenic plasma lipid profile, enzyme paraoxonase 1 activity and gene PON1 polymorphism in patients with coronary artery disease

A.N. Voitovich¹, M.A. Bogdanova¹, B.I. Smirnov², M.I. Badmaeva³, G.D. Pardo Perales⁴,
D.V. Cherkashin⁵, S.A. Boitsov⁶, N.V. Kirillova⁴, O.A. Berkovich³, E.V. Shlyakhto³, V.I. Larionova¹

¹St Petersburg State Pediatric Medical Academy, St Petersburg, Russia

²St Petersburg State Electrotechnical University, St Petersburg, Russia

³St Petersburg Pavlov State Medical University, St Petersburg, Russia

⁴St Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy, St Petersburg, Russia

⁵Military Medical Academy, St Petersburg, Russia

⁶Cardiology Research Center, Moscow, Russia

Corresponding author: 2 Litovskaya st., St Petersburg, Russia, 194100. Phone: 8 (812) 295-10-71. E-mail: anna_voitovich@yahoo.com (Anna N. Voitovich, Researcher).

Abstract

Objective. To assess possible association between PON1 activity, *PON1* gene polymorphism, plasma lipid spectrum alterations, and the oxidative stress level in coronary artery disease (CAD) development. **Design and methods.** 227 male patients with CAD (mean age 46,9 ± 0,5 years), survived myocardial infarction being under 45 years old, and 114 healthy men (mean age 40,0 ± 0,5 years). Plasma total cholesterol (TC), triglyceride (TG), high-density lipoprotein cholesterol (HDL) levels, and arylesterase PON1 activity have been measured. Plasma malondialdehyde (MDA) concentrations, a lipid peroxidation product, were used as a marker of the oxidative stress levels. Q192R and L55M polymorphisms of the *PON1* gene have been identified using PCR-RFLP. **Results.** CAD patients had significantly higher levels of TC and TG ($p = 0,024$ and $p < 0,001$, respectively), and significantly lower levels of HDL ($p < 0,001$), compared to the controls. Plasma MDA levels were significantly higher in CAD patients than in the controls ($p < 0,001$), and correlated positively with TC and TG levels ($p = 0,01$ and $p < 0,001$, respectively). The patients had significantly lower levels of serum PON1 activity ($p < 0,001$), which directly correlated with HDL levels ($p = 0,05$). Also among the patients, there was difference in PON1 activity depending on the Q192R polymorphism in the *PON1* gene. RR-homozygotes had significantly lower levels of serum PON1 activity compared to QQ-homozygotes ($p = 0,012$). **Conclusions.** Thus, investigation of the PON1 activity together with atherosclerosis risk factors, such as oxidative stress, atherogenic plasma lipid profile and genetic polymorphism, is important for CAD diagnostics and treatment.

Key words: coronary artery disease, paraoxonase 1, genetic polymorphism.

Статья поступила в редакцию: 20.04.10. и принята к печати: 23.07.10.

Введение

Клинические проявления атеросклероза, такие как ишемическая болезнь сердца (ИБС), остаются основной причиной смертности в России [1]. Поэтому исследование факторов риска развития атеросклероза с целью усовершенствования программ ранней диагностики и лечения является одной из важнейших задач кардиологии.

Наряду с традиционными факторами риска развития атеросклероза, в последнее время в литературе широко обсуждается роль окислительного стресса, который формируется в результате дисбаланса между проокислительным и антиокислительным процессами в крови [2–3]. Активные формы кислорода (супероксид, перекись водорода, гидроксил) подвергают окислительной модификации белки, липиды и углеводы крови, оказывая на них повреждающее действие. В свою очередь факторы антиоксидантной защиты восстанавливают окисленные компоненты крови, препятствуя развитию окислительного стресса [4].

К настоящему времени наиболее изучен процесс воздействия активных форм кислорода (АФК) на липиды. При атаке АФК происходит свободнорадикальное окисление полиненасыщенных жирных кислот, так называемое перекисное окисление липидов (ПОЛ). Было установлено, что перекисное окисление липидов в со-

ставе липопротеинов крови является иницирующим этапом атерогенеза [5]. Подвергшиеся окислительной модификации липопротеины крови являются лигандами для рецепторов моноцитов на поверхности эндотелия сосудов. Активированные моноциты проникают в субэндотелиальное пространство сосудов, превращаясь в макрофаги, поглощающие и накапливающие модифицированные липопротеины, и затем в пенные клетки, образующие атеросклеротическую бляшку.

Считается, что одним из основных ферментов крови, осуществляющих гидролиз окисленных липидов в составе липопротеинов, является кальций-зависимая гидролаза параоксоназа 1, которая обладает значительным антиоксидантным действием [6–7]. Параоксоназа 1 (PON1) в сыворотке крови находится в связанном состоянии с липопротеинами высокой плотности (ЛПВП) [8]. Было установлено, что PON1 снижает уровень окислительной модификации липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) *in vitro*, осуществляя гидролиз окисленных липидов [9]. Кроме того, PON1 защищает и сами ЛПВП от окисления, позволяя сохранять их антиатерогенные свойства [10–11]. Таким образом, PON1 выполняет антиатерогенную функцию.

Имеется много данных о связи уровня активности фермента параоксоназы 1 с развитием атеросклероза и

его осложнений [7]. Кроме того, на активность PON1 могут влиять многие из признанных факторов риска атеросклероза. Например, курение способствует снижению, а алкоголь — увеличению активности PON1 [12–13]. При некоторых патологических состояниях (инфаркт миокарда, сахарный диабет тип 2, семейная гиперхолестеринемия) активность PON1 снижена [14]. Прием таких лекарственных препаратов, как статины и фибраты, приводит к повышению активности PON1 [13, 15]. Было установлено, что индивидуальные различия в активности PON1 в плазме крови могут быть ассоциированы с уровнями холестерина (ХС) ЛПВП [16]. Выявлено, что с возрастом активность PON1 снижается, что объясняется большей подверженностью к окислению ЛПНП у лиц старшего возраста [17].

Однако основным фактором, определяющим индивидуальную изменчивость активности PON1, считается генетический полиморфизм [18–20]. На данный момент хорошо изучены полиморфизмы кодирующей области гена *PON1* L55M (rs854560) и Q192R (rs662). Были установлены различия в уровне активности PON1 по отношению к разным субстратам в зависимости от генетического полиморфизма Q192R [19–21]. Установлено, что изоформа белка Q192 обладает значительно сниженной параоксоназной активностью и осуществляет гидролиз нефизиологического субстрата параоксона менее эффективно, чем изоформа 192R. В то же время уровень арилэстеразной активности, который определяется с использованием в качестве субстрата фенилацетата, одинаков у обеих форм [19–21]. С другой стороны, изоформа Q192 обладала более высокой гидролитической активностью по отношению к окисленным ЛПНП и ЛПВП, по сравнению с изоформой 192R [22–23]. В последнее время обсуждается роль липолактоназной активности PON1 в антиатерогенной функции ЛПВП. Было выявлено, что благодаря своей липолактоназной активности PON1 может осуществлять гидролиз окисленных фосфолипидов плазматической мембраны макрофагов с образованием липолактонов, являющихся модуляторами местного воспалительного процесса и стимуляторами обратного транспорта холестерина. Исходя из этого, было сделано предположение, что именно лактоназная активность PON1 определяет антиатерогенные свойства ЛПВП, в то время как параоксоназная и арилэстеразная активности являются второстепенными [24–25]. Также было выявлено, что уровень лактоназной активности PON1 тоже различается между двумя белковыми изоформами Q192 и 192R [21]. Таким образом, вопрос биохимической и генетической природы физиологической активности PON1, лежащей в основе ее антиатерогенной функции, до сих пор остается невыясненным.

Цель исследования

Цель данной работы заключалась в исследовании арилэстеразной активности параоксоназы 1 у больных ИБС в сопоставлении со структурными особенностями кодирующего ее гена *PON1*, уровнями липидных и липопротеиновых показателей крови и показателей перекисного окисления липидов (ПОЛ).

Материалы и методы

Всего обследовано 227 мужчин (средний возраст $46,9 \pm 0,5$ года), больных ИБС, перенесших инфаркт миокарда (ИМ) в возрасте до 45 лет, и 114 мужчин без признаков патологии сердечно-сосудистой системы в возрасте от 28 до 56 лет (средний возраст $40,0 \pm 0,5$ года). У здоровых мужчин ИБС была исключена посредством клинических, лабораторных и инструментальных исследований — электрокардиографического, эхокардиографического исследований, холтеровского мониторирования, велоэргометрии.

Уровень ПОЛ оценивали по содержанию конечного продукта ПОЛ, малонового диальдегида (МДА), измеренного у 102 пациентов и 80 здоровых мужчин по методу Ф.А. Тугушевой и соавт. [26].

Арилэстеразную активность PON1 сыворотки крови определили у 71 пациента и 25 здоровых мужчин с использованием в качестве субстрата фенилацетата. Скорость гидролиза субстрата измеряли спектрофотометрически при длине волны 270 нм и пересчитывали в нмоль/(мл × мин.) [27–28].

Определение концентрации общего холестерина (ОХС), ХС ЛПВП, триглицеридов (ТГ) в сыворотке крови производилось в автоматическом режиме на анализаторе Hitachi 902 Automatic Analyzer (Япония). Содержание ХС липопротеинов очень низкой плотности (ХС ЛПОНП) определяли расчетным методом по формуле $\text{ХС ЛПОНП} = \text{ТГ}/2,2$ (ммоль/л) и ХС ЛПНП по формуле Friedewald $\text{ХС ЛПНП} = \text{ОХС} - (\text{ХС ЛПВП} + \text{ТГ}/2,2)$, а коэффициент атерогенности (КА) по формуле $\text{КА} = (\text{ОХС} - \text{ХС ЛПВП})/\text{ХС ЛПВП}$ [29]. Все липидные показатели крови были пересчитаны в мг/дл.

Для выделения дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) из лимфоцитов периферической крови использовали фенол-хлороформный метод [30].

Аллели Q192 и 192R гена *PON1* были определены методом длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ). Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) были использованы праймеры: 5'-TATTGTTGCTGTGGGACCTGAG3' и 5'-CACGCTAAACCCAAATACATCTC3' (ЗАО «Синтол», Россия). Рестрикция проводилась с помощью эндонуклеазы Kzo9I («Сибензим», Россия). Электрофоретическое разделение рестрикционных фрагментов производилось в 10 % полиакриламидном геле [31].

Аллели L55 и 55M гена *PON1* определялись методом ПДРФ. Для проведения ПЦР были использованы праймеры: 5'-GAAGAGTGATGTATAGCCCCAG3' и 5'-TTTAATCCAGAGCTAATGAAAGCC3' (ЗАО «Синтол», Россия). Рестрикция проводилась с помощью эндонуклеазы FaeI («Сибензим», Россия). Электрофоретическое разделение рестрикционных фрагментов также производилось в 10 % полиакриламидном геле [31].

Статистический анализ проводили с помощью пакета статистических программ SPSS ver.15. В работе приведены средние величины со стандартной ошибкой среднего значения ($M \pm m$). Для сравнения параметров распределения количественных показателей (средних, медиан) в обследованных группах использовали не-

параметрические методы — U-тест Манна-Уитни. Для сравнения параметров качественных показателей использовали тест Хи-квадрат и точный критерий Фишера. Для определения корреляции между количественными показателями использовали метод корреляции по Спирману. Для анализа влияния генотипов на активность PON1 применяли однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с уточняющим дополнительным тестом: для однородных групп тест множественного сравнения Шеффе, для неоднородных групп — тест Тэмхена 2. За значимый принимали уровень достоверности $p < 0,05$ [32].

Результаты

У больных, перенесших ИМ в возрасте до 45 лет, уровни ОХС, ХС ЛПОНП и ТГ оказались достоверно выше, а ХС ЛПВП — достоверно ниже, по сравнению с показателями у здоровых мужчин (табл. 1). Таким образом, у больных, перенесших ИМ в молодом возрасте, были выявлены более значимые нарушения липидного спектра, чем у здоровых мужчин.

Уровни МДА, конечного метаболита ПОЛ, в плазме крови и в эритроцитах больных, перенесших ИМ, были достоверно выше, чем уровни аналогичного показателя у здоровых мужчин (табл. 1). Была установлена прямая корреляция между уровнями МДА и ОХС ($r = 0,26$; $p = 0,01$), ТГ ($r = 0,42$; $p = 0,001$) и ХС ЛПОНП ($r = 0,39$; $p = 0,001$) в группе мужчин, перенесших ИМ в молодом возрасте. Обращает на себя внимание тот факт, что в группе здоровых мужчин такие же корреляционные связи были выявлены для уровней МДА и уровней ОХС ($r = 0,26$; $p = 0,02$), ТГ ($r = 0,24$; $p = 0,04$) и ХС ЛПОНП ($r = 0,25$; $p = 0,03$).

Анализ уровня активности PON1 сыворотки крови выявил достоверное снижение активности фермента у больных, перенесших ИМ до 45 лет, по сравнению с этим показателем в группе здоровых мужчин (табл. 1). Была установлена прямая корреляция активности PON1 с уровнями ХС ЛПВП в группе мужчин, перенесших ИМ до 45 лет ($r = 0,24$; $p = 0,05$). В то же время не выявлено корреляционных связей активности этого фермента с

уровнями ХС ЛПВП сыворотки крови в группе здоровых мужчин.

Не было выявлено корреляционных связей между уровнем активности PON1 и уровнем МДА в обеих обследованных группах мужчин (здоровые мужчины $r = 0,06$, $p = 0,774$; мужчины с ИМ $r = -0,12$, $p = 0,467$).

Частоты аллелей и генотипов Q192R и L55M гена *PON1* в исследуемой выборке достоверно не отличались от теоретически ожидаемых в соответствии с законом Харди-Вайнберга (табл. 2).

Сравнение распределения генотипов L55M и Q192R в группе здоровых мужчин и мужчин, перенесших ИМ в молодом возрасте, не выявило статистически значимых различий ($\chi^2 = 0,642$; $p = 0,725$ и $\chi^2 = 1,674$; $p = 0,433$ соответственно). Также показатели липидного спектра у носителей разных генотипов по гену *PON1* значимо не различались в обеих группах.

Анализ активности параоксоназы при различных генотипах *PON1* Q192R не показал значимых различий в группе здоровых мужчин ($p = 0,141$). В то же время выявлены статистически достоверные различия в активности PON1 в группе мужчин, перенесших ИМ до 45 лет, между носителями генотипов QQ и RR (табл. 3). Активность PON1 у носителей генотипа RR была значимо ниже, чем у носителей генотипа QQ ($p = 0,012$). У носителей гетерозиготного генотипа QR были промежуточные значения активности PON1, которые незначимо отличались от значений активности PON1 у гомозигот QQ, и RR ($p = 0,062$; $p = 0,507$ соответственно). При этом в группе здоровых мужчин гомозиготы QQ имели более низкие значения активности PON1 по сравнению с носителями аллеля 192R, но не достоверно ($p = 0,141$). А в группе больных гомозиготы QQ имели более высокие значения активности PON1 по сравнению с носителями аллеля 192R ($p = 0,054$).

Анализ активности параоксоназы в зависимости от варианта L55M гена *PON1* в группе здоровых мужчин и больных мужчин, перенесших ИМ до 45 лет, не выявил различий в активности PON1 (табл. 2) между носителями разных генотипов ($p = 0,817$; $p = 0,841$ соответственно).

Таблица 1

ПОКАЗАТЕЛИ ЛИПИДНОГО СПЕКТРА КРОВИ, УРОВЕНЬ МАЛОНОВОГО ДИАЛЬДЕГИДА И АКТИВНОСТЬ ПАРАОКСОНАЗЫ 1 У ПАЦИЕНТОВ, ПЕРЕНЕСШИХ ИНФАРКТ МИОКАРДА В ВОЗРАСТЕ ДО 45 ЛЕТ, И ЗДОРОВЫХ МУЖЧИН

Показатель	Мужчины с ИМ до 45 лет	Здоровые мужчины	p
ОХС, мг/дл	230,0 ± 4,8	212,0 ± 4,6	0,024
ТГ, мг/дл	218,8 ± 12,7	120,1 ± 7,1	< 0,001
ХС ЛПВП, мг/дл	38,2 ± 1,0	43,4 ± 1,1	< 0,001
ХС ЛПНП, мг/дл	150,4 ± 4,1	145,6 ± 4,3	0,948
ХС ЛПОНП, мг/дл	44,5 ± 2,6	23,5 ± 1,3	< 0,001
МДА, нмоль/мл	10,4±0,5	7,9±0,3	< 0,001
Активность PON1, нмоль/(мл × мин.)	8,3 ± 0,9	22,7 ± 2,3	< 0,001

Примечание: ОХС — общий холестерин; ТГ — триглицериды; ХС ЛПВП — холестерин липопротеинов высокой плотности; ХС ЛПНП — холестерин липопротеинов низкой плотности; ХС ЛПОНП — холестерин липопротеинов очень низкой плотности; МДА — малоновый диальдегид; PON1 — параоксоназа 1.

Таблица 2

ЧАСТОТЫ ГЕНОТИПОВ ПО ГЕНУ *PON1* У ПАЦИЕНТОВ, ПЕРЕНЕСШИХ ИНФАРКТ МИОКАРДА В ВОЗРАСТЕ ДО 45 ЛЕТ, И ЗДОРОВЫХ МУЖЧИН

Генотип	Мужчины с инфарктом миокарда до 45 лет	Здоровые мужчины	p
	число (%)	число (%)	
Полиморфизм L55M			
Генотип LL	97 (44)	39 (48)	0,725
Генотип LM	101 (46)	33 (41)	
Генотип MM	22 (10)	9 (11)	
Полиморфизм Q192R			
Генотип QQ	129 (57)	76 (66)	0,433
Генотип QR	80 (35)	34 (30)	
Генотип RR	18 (8)	5 (4)	

Таблица 3

УРОВНИ АКТИВНОСТИ ПАРАОКСОНАЗЫ 1 В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ГЕНОТИПА В ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУППАХ МУЖЧИН

Генотип	Мужчины с инфарктом миокарда до 45 лет		Здоровые мужчины	
	Число	Активность PON1, нмоль/(мл × мин.)	Число	Активность PON1, нмоль/(мл × мин.)
Полиморфизм L55M				
LL	32	8,5 ± 1,3	7	24,2 ± 5,5
LM	30	8,5 ± 1,6	15	22,6 ± 2,2
MM	8	6,8 ± 1,6	2	19,0 ± 0,1
Полиморфизм Q192R				
QQ	44	9,9 ± 1,3	21	21,6 ± 1,7
QR	23	5,9 ± 1,1	2	20,4 ± 0,3
RR	4	3,7 ± 1,2	2	35,8 ± 18,9

Обсуждение

В данной работе у больных ИБС, перенесших ИМ в молодом возрасте, жителей Санкт-Петербурга, с целью анализа антиатерогенной роли фермента параоксоназы 1 была исследована арилэстеразная активность PON1 в сопоставлении со структурными особенностями кодирующего ее гена *PON1*, липидными и липопротеиновыми показателями крови и показателями перекисного окисления липидов.

Для оценки уровня ПОЛ в исследованных группах мы измерили содержание конечного продукта ПОЛ — малонового диальдегида. МДА является продуктом окисления арахидоновой кислоты фосфолипидов, в том числе и фосфолипидов в составе ЛПНП. Было установлено, что уровни его повышены у больных ИБС [33–35]. В нашем исследовании уровни МДА также были повышены у мужчин с ИБС, по сравнению с этим показателем у здоровых мужчин, что согласуется с результатами других исследователей. Также значения уровня МДА и у здоровых мужчин, и у больных ИБС находились в прямой корреляции со уровнями ОХС, ТГ и ХС ЛПОНП сыворотки кро-

ви, являющимися субстратом для ПОЛ. При этом у больных ИБС именно уровни ОХС, ТГ и ХС ЛПОНП были статистически значимо выше, по сравнению с таковыми у здоровых мужчин. Таким образом, уровни и субстратов для ПОЛ, и конечного продукта ПОЛ в крови у мужчин с ИБС, перенесших ИМ в молодом возрасте, были выше, чем у здоровых мужчин сопоставимого возраста. Следовательно, окислительный процесс у больных ИБС протекал интенсивнее, чем у здоровых мужчин, и коррелировал с нарушениями липидного спектра крови.

В нашей работе мы установили, что у мужчин с ИБС уровни арилэстеразной активности PON1 были значительно снижены, по сравнению с этим показателем в группе здоровых мужчин, что согласуется с данными других авторов [12, 36–38]. Также мы установили, что уровень арилэстеразной активности параоксоназы 1 коррелировал с уровнем ХС ЛПВП в группе больных, а в группе здоровых мужчин сопоставимого возраста корреляция отсутствовала. Дело в том, что у мужчин с ИБС уровни ХС ЛПВП были достоверно ниже, чем данный показатель у здоровых мужчин. В то же время

известно, что PON1 имеет более высокую активность в связанном состоянии с ЛПВП, чем в свободной форме [21, 24, 39]. Во-вторых, как мы установили исходя из уровней МДА, у мужчин с ИБС процесс ПОЛ протекал интенсивнее, а, следовательно, и количество окисленных липопротеинов в крови должно быть больше, что влияет на активность PON1, потому что, как было установлено другими исследователями, гидролизуя окисленные липиды, PON1 необратимо теряет активность [40]. Таким образом, нарушения липидного спектра крови у больных ИБС оказывают влияние на активность PON1.

Далее мы выяснили, что у больных, перенесших ИМ в молодом возрасте, полиморфизм Q192R гена *PON1* был ассоциирован с арилэстеразной активностью PON1. Гомозиготные носители аллеля 192R обладали достоверно более низкими уровнями активности PON1, чем гомозиготные носители аллеля Q192. Вместе с тем у здоровых мужчин полиморфизм Q192R не был ассоциирован с уровнями активности PON1. Известно, что позиция 192 белка PON1 является частью сайта активности фермента [21], а полиморфизм данной позиции изменяет чувствительность фермента к субстрату. При этом было выявлено, что в основе данного явления лежит более высокое сродство изоформы 192R к белку аполипопротеину AI (ApoAI) в составе ЛПВП, чем изоформы Q192 [21, 24, 39]. Мы полагаем, что фракция белка PON1, содержащего аминокислоту 192R, обладающая лучшим сродством к ЛПВП, быстрее и в большей концентрации связывается с ЛПВП, вследствие чего активность PON1 в сыворотке крови становится выше к различным субстратам, в том числе и к окисленным липопротеинам крови. Гидролизуя окисленные липопротеины крови, PON1 необратимо теряет свою гидролитическую активность по отношению к своему физиологическому субстрату, которым, по мнению некоторых авторов, являются липолактоны в составе мембраны макрофагов и не может выполнять свои физиологические функции в виде участия в транспорте холестерина из макрофагов в ЛПВП [24–25].

Таким образом, в нашей работе мы установили, что повышение уровня окислительного процесса и уровней атерогенных липопротеинов крови вместе со снижением уровня ЛПВП связано со снижением гидролитической активности PON1. При этом более активная изоформа 192R теряет ее быстрее, поэтому у носителей варианта 192R активность PON1 значительно снижена по сравнению с обладателями генотипа QQ. Носительство аллеля 192R может определять повышенный риск ИМ у людей с высокими уровнями атерогенных липопротеинов крови, низкими уровнями ХС ЛПВП или высоким уровнем ПОЛ в крови.

Например, было выявлено, что курение снижает активность PON1 [41]. Возможно, это связано с тем, что курение повышает проокислительный статус крови, который в свою очередь снижает гидролитическую активность PON1. Интересно отметить, что курение модифицирует ассоциацию между генетическим полиморфизмом Q192R *PON1* и риском ИМ. Было установлено, что если у некурящих связь между генотипом

и риском ИМ была значимой, то в группе курильщиков она теряла значение, то есть эффект от курения был настолько высок, что скрывал более слабый генетический эффект [41].

У пациентов с сахарным диабетом тип 2 и семейной гиперхолестеринемией активность PON1 также снижена, и причиной этого, по всей видимости, являются липидные нарушения, характерные для данных заболеваний.

Установлено, что прием гиполипидемических препаратов, статинов и фибратов повышает активность PON1. В промоторной области гена *PON1* располагается сайт связывания с транскрипционным фактором SREBP-2 (sterol regulatory element-binding protein-2). Ингибируя синтез холестерина в гепатоцитах, статины стимулируют активность SREBP-2, который связывается с участком промоторной области гена *PON1*, активируя экспрессию гена, результатом чего является повышение концентрации, а, следовательно, и активности белка PON1 в сыворотке крови [15]. Известно, что экспрессия гена *SREBP-2* контролируется с участием белков PPAR класса gamma (peroxisome proliferator-activated receptors), регулирующих липидный обмен. Фибраты оказывают гиполипидемическое действие на организм, активируя работу PPAR. Поэтому, возможно, что фибраты также увеличивают активность *PON1* через описанный механизм. Важно отметить, что одним из активаторов PPAR является физическая активность, в результате которой в крови увеличивается концентрация лигандов для PPAR. Следовательно, физическая активность также может влиять на концентрацию и активность PON1 в сыворотке крови.

Во многих работах была выявлена связь между полиморфизмом Epsilon по гену аполипопротеина E (*APOE*) и активностью PON1 [42]. Носительство аллеля E4 по гену *APOE* было ассоциировано со сниженной активностью PON1. Ранее было установлено, что гидролитическая активность PON1 зависит не только от белка ApoAI в составе ЛПВП, но и от наличия белка ApoE. И в отсутствие обоих апо-белков арилэстеразная активность PON1 сильно редуцирована [39]. По-видимому, в основе механизма влияния ApoE на активность и стабильность PON1 лежит такой же принцип, как и в механизме влияния на стабильность PON1 белка ApoAI [43].

Таким образом, большое количество генетических и внешних факторов риска атеросклероза оказывают влияние на активность PON1, которая в свою очередь становится дополнительным фактором риска.

Заключение

Исследование активности PON1 у больных ИБС, наряду с факторами риска атеросклероза, влияющими на нее, таких как окислительный стресс, атерогенный липидный профиль сыворотки крови и генетический полиморфизм, важно для дифференцированного подхода к диагностике и лечению ИБС.

Литература

1. Оганов Р.Г., Масленникова Г.Я. Развитие профилактической кардиологии в России // Кардиоваск. терапия и профилактика. — 2004. — Т. 3, № 3. — С. 11–14.

2. Климов А.Н., Никульчева Н.Г. Обмен липидов и липопротеидов и его нарушения // Руководство для врачей. — СПб., 1999. — 262 с.
3. Escola-Gil J.C., Calpe-Berdiel L., Palomer X. et al. Antiatherogenic role of high-density lipoproteins: insights from genetically engineered-mice // *Front. Biosci.* — 2006. — Vol. 1, № 11. — P. 1328–1348.
4. Lamb R.E., Goldstein B.J. Modulating an oxidative-inflammatory cascade: potential new treatment strategy for improving glucose metabolism, insulin resistance, and vascular function // *Int. J. Clin. Pract.* — 2008. — Vol. 62, № 7. — P. 1087–1095.
5. Navab M., Ananthramaiha G.M., Reddy S.T. et al. The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL // *J. Lipid Res.* — 2004. — Vol. 45, № 6. — P. 993–1007.
6. La Du B., Aviram M., Billecke S. et al. On the physiological role(s) of the paraoxonases // *Chem. Biol. Interact.* — 1999. — Vol. 119, № 120. — P. 379–388.
7. Mackness B., Durrington P.N., Mackness M.I. The paraoxonase gene family and coronary heart disease // *Curr. Opin. Lipidol.* — 2002. — Vol. 13, № 4. — P. 357–362.
8. Aviram M., Rosenblat M. Paraoxonases and cardiovascular diseases: pharmacological and nutritional influences // *Curr. Opin. Lipidol.* — 2005. — Vol. 16, № 4. — P. 393–399.
9. Mackness M.I., Arrol S., Durrington P.N. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein // *FEBS Lett.* — 1991. — Vol. 286, № 1–2. — P. 152–154.
10. Aviram M., Rosenblat M., Bisgaier C.L. et al. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase // *J. Clin. Invest.* — 1998. — Vol. 101, № 8. — P. 1581–1590.
11. Navab M., Hama S.Y., Anantharamaiha G.M. et al. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3 // *J. Lipid Res.* — 2000. — Vol. 41, № 9. — P. 1495–1508.
12. Jarvik G.P., Hatsukami T.S., Carlson C. et al. Paraoxonase activity, but not haplotype utilizing the linkage disequilibrium structure, predicts vascular disease // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2003. — Vol. 23, № 8. — P. 1465–1471.
13. Thyagarajan B., Jacobs D.R., Carr J.J. et al. Factors associated with paraoxonase genotypes and activity in a diverse, young, healthy population: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) study // *Clin. Chem.* — 2008. — Vol. 54, № 4. — P. 738–746.
14. Deakin S., James R. Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-1 // *Clin. Sci.* — 2004. — Vol. 107, № 5. — P. 435–447.
15. Deakin S., Leviev I., Guernier S. et al. Simvastatin modulates expression of the PON1 gene and increases serum paraoxonase: a role for sterol regulatory element-binding protein-2 // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2003. — Vol. 23, № 11. — P. 2083–2089.
16. Saha N., Roy A.C., Teo S.H. et al. Influence of serum paraoxonase polymorphism in serum lipids and apolipoproteins // *Clin. Genet.* — 1991. — Vol. 40, № 4. — P. 277–282.
17. Cherki M., Berrougui H., Isabelle M. et al. Effect of PON1 polymorphism on HDL antioxidant potential is blunted with aging // *Exp. Gerontol.* — 2007. — Vol. 42, № 8. — P. 815–824.
18. Playfer J.R., Eze L.C., Bullen M.F. et al. Genetic polymorphism and interethnic variability of plasma paraoxonase activity // *J. Med. Genet.* — 1976. — Vol. 13, № 5. — P. 337–342.
19. Humbert R., Adler D.A., Distechi C.M. et al. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism // *Nat. Genet.* — 1993. — Vol. 3, № 1. — P. 73–76.
20. Adkins S., Gan K.N., Mody M. et al. Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraoxonase/arylesterase: glutamine for arginine at position 191, for the respective A or B alleles // *Am. J. Hum. Genet.* — 1993. — Vol. 52, № 3. — P. 598–608.
21. Gaidukov L., Rosenblat M., Aviram M. et al. The 192R/Q polymorphisms of serum paraoxonase PON1 differ in HDL binding, lipolactonase stimulation, and cholesterol efflux // *J. Lipid Res.* — 2006. — Vol. 47, № 11. — P. 2492–2502.
22. Hegele R.A., Brunt J.H., Connelly P.W. A polymorphism of the paraoxonase gene associated with variation in plasma lipoproteins in a genetic isolate // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 1995. — Vol. 15, № 1. — P. 89–95.
23. Aviram M., Hardak E., Vaya J. et al. Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions: PON1 esterase and peroxidase-like activities // *Circulation.* — 2000. — Vol. 101, № 21. — P. 2510–2517.
24. Draganov D.I., Teiber J.F., Speelman A. et al. Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities // *J. Lipid Res.* — 2005. — Vol. 46, № 6. — P. 1239–1247.
25. Rosenblat M., Gaidukov L., Khersonsky O. et al. The catalytic histidine dyad of high density lipoprotein-associated serum paraoxonase-1 (PON1) is essential for PON1-mediated inhibition of low density lipoprotein oxidation and stimulation of macrophage cholesterol efflux // *J. Biol. Chem.* — 2006. Vol. 281, № 11. — P. 7657–7665.
26. Тугушева Ф.А., Куликова А.И., Зубина И.М. Особенности перекисного окисления липидов крови больных хроническим гломеруло-нефритом в стадии нарушения функции почек на фоне нефротического синдрома // *Вопр. мед. химии.* — 1993. — Т. 39, № 2. — С. 18–21.
27. Eckerson H.W., Romson J., Wytte C. et al. The human serum paraoxonase polymorphism: identification of phenotypes by their response to salts // *Am. J. Hum. Genet.* — 1983. — Vol. 35, № 2. — P. 214–227.
28. Kujiraoka T., Oka T., Ishihara I. et al. A sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for human serum paraoxonase concentration // *J. Lipid Res.* — 2000. — Vol. 41, № 8. — P. 1358–1363.
29. Климов А.Н., Перова Н.В., Трюфанов В.Ф. и др. Липиды и липопротеиды плазмы крови в популяциях мужчин и женщин в возрастном аспекте // *Эпидемиология и факторы риска ишемической болезни сердца* / Под ред. А.Н. Климова. — Л., 1989. — С. 36–57.
30. Blin N., Stafford D.W. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes // *Nucleic Acids Res.* — 1976. — Vol. 3, № 99. — P. 2303–2308.
31. Oliveira S.A., Mansur A.P., Ribeiro C.C. et al. PON1 M/L55 mutation protects high-risk patients against coronary artery disease // *Int. J. Cardiol.* — 2004. — Vol. 94, № 1. — P. 73–77.
32. Флетчер Р., Флетчер С., Вагнер Э. Клиническая эпидемиология. — М.: Медиа Сфера, 1998. — С. 264–267.
33. Ланкин В.З., Тихазе А.К., Беленков Ю.Н. Свободнорадикальные процессы при заболеваниях сердечно-сосудистой системы // *Кардиология.* — 2000. — Т. 40, № 7. — С. 48–61.
34. Irshad M., Chaudhuri P.S. Oxidant-antioxidant system: role and significance in human body // *Indian J. Exp. Biol.* — 2002. — Vol. 40, № 11. — P. 1233–1239.
35. Valko M., Leibfritz D., Moncol J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* — 2007. — Vol. 39, № 1. — P. 44–84.
36. Ferré N., Tous M., Paul A. et al. Paraoxonase Gln-Arg(192) and Leu-Met(55) gene polymorphisms and enzyme activity in a population with a low rate of coronary heart disease // *Clin. Biochem.* — 2002. — Vol. 35, № 3. — P. 197–203.
37. van Himbergen T.M., van der Schouw Y.T., Voorbij H.A. et al. Paraoxonase (PON1) and the risk for coronary heart disease and myocardial infarction in a general population of Dutch women // *Atherosclerosis.* — 2008. — Vol. 199, № 2. — P. 408–414.
38. Senturk T., Sarandol E., Gullulu S. et al. Serum arylesterase activity is negatively correlated with inflammatory markers in patients with acute coronary syndromes // *Saudi Med. J.* — 2009. — Vol. 30, № 3. — P. 334–339.
39. Cabana V.G., Reardon C.A., Feng N. et al. Serum paraoxonase: effect of the apolipoprotein composition of HDL and the acute phase response // *J. Lipid Res.* — 2003. — Vol. 44, № 4. — P. 780–792.
40. Gocmen A.Y., Gumuslu S., Semiz E. Association between paraoxonase-1 activity and lipid peroxidation indicator levels in people living in the Antalya region with angiographically documented coronary artery disease // *Clin. Cardiol.* — 2004. — Vol. 27, № 7. — P. 426–430.
41. Sen-Banerjee S., Siles X., Campos H. Tobacco smoking modifies association between Gln-Arg192 polymorphism of human paraoxonase gene and risk of myocardial infarction // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2000. — Vol. 20, № 9. — P. 2120–2126.
42. Balcerzyk A., Zak I., Krauze J. Protective effect of R allele of PON1 gene on the coronary artery disease in the presence of specific genetic background // *Dis. Markers.* — 2008. — Vol. 24, № 2. — P. 81–88.
43. Gaidukov L., Viji R.I., Yacobson S. et al. ApoE induces serum paraoxonase PON1 activity and stability similar to ApoA-I // *Biochemistry.* — 2010. — Vol. 49, № 3. — P. 532–538.