ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи



Ерощенко Николай Николаевич

Комплексный подход к профилированию жирных кислот в крови для оптимизации фармакотерапии атеросклероза

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, доцент
Лебедева Светлана Анатольевна

Москва – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 14
1.1. Метаболические и воспалительные механизмы развития атеросклероза 14
1.2. Подходы к фармакологической коррекции атеросклероза 15
1.3. Роль жирных кислот в патогенезе атеросклероза 21
1.4. Плейотропные эффекты статинов и метаболизм жирных кислот 25
1.5. Современные маркеры на основе жирных кислот 30
1.6. Современные методологические подходы к аналитической оценке жирных кислот и их ограничения в фармакологических исследованиях 33
1.7. Научные предпосылки к разработке новых биомаркеров на основе профиля жирных кислот 37
1.8. Заключение по обзору литературы 39
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 42
2.1. Дизайн исследования 42
2.2. Характеристика исследуемых групп 45
2.3. Лабораторные методы исследования 48
2.3.1. Исследование профиля жирных кислот в крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией 48
2.3.2. Определение стандартных показателей липидного профиля для верификации сопоставимости выборки с данными литературы 51
2.4. Принципы количественного определения аналитов и расчета производных показателей 52
2.5. Методы статистической обработки и анализа данных 54
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ 58
3.1. Разработка оригинальной аналитической методики исследования жирных кислот 58

3.1.1. Выбор аналитического подхода и перечень фармакологически значимых аналитов 58
3.1.2. Оптимизация условий высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией и процедуры подготовки проб 60
3.1.3. Обоснование применения аммонийных аддуктов метиловых эфиров жирных кислот при электрораспылительной ионизации 71
3.1.4. Аналитические характеристики метода 74
3.1.4.1. Валидация метода 74
3.1.4.2. Сравнение сигналов аддуктов метиловых эфиров жирных кислот $[M+H]^+$ и $[M+NH_4]^+$ при анализе реальных образцов 77
3.2. Разработка математической модели расчета омега-3 индекса по данным плазмы крови 79
3.3. Сравнительный анализ состава жирных кислот плазмы крови у пациентов с атеросклерозом и лиц контрольной группы 85
3.3.1. Сравнительная характеристика профиля жирных кислот в группах «Атеросклероз» и «Контроль» 85
3.3.2. Оценка профиля жирных кислот плазмы крови при атеросклерозе в зависимости от применения аторвастатина и розувастатина 91
3.3.3. Связь липидного профиля с омега-3 статусом и терапией статинами 95
3.4. Сравнительная информативность показателей профиля жирных кислот при терапии статинами 100
3.5. Разработка и оценка информативности индекса баланса омега-6/омега-3 и комбинированной логит-модели на основе профиля жирных кислот 106
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ 123
ВЫВОДЫ 156
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ 158
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ 159
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 162
Приложение А 197
Приложение Б 199

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) атеросклеротического генеза сохраняют ведущие позиции по распространенности и смертности населения во всём мире, несмотря на широкое применение современной гиполипидемической терапии [200]. Атеросклеротический процесс связан с нарушениями липидного обмена и хроническим воспалением сосудистой стенки, которое может сохраняться после достижения целевых уровней холестерина липопротеинов низкой плотности (ХС ЛПНП), формируя остаточный воспалительный риск (ОВР) [167, 225]. Клиническую значимость воспалительного компонента подтверждают результаты исследования CANTOS [227] и LoDoCo2 [202], в которых применение таргетных противовоспалительных средств канакинумаба и колхицина в низких дозах обеспечивало дополнительное снижение частоты сердечно-сосудистых событий (ССС) на фоне стандартной гиполипидемической терапии. Эти данные обосновывают необходимость поиска биомаркеров, отражающих воспалительно-метаболическое звено патогенеза и пригодных для персонализации терапии.

Одним из ключевых звеньев, связывающих липидный обмен и воспаление, является метаболизм полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) семейств омега-3 и омега-6. Эйкозапентаеновая (ЭПК) и докозагексаеновая (ДГК) кислоты служат предшественниками специализированных проразрешающих медиаторов (СПМ) [67, 252]. СПМ активируют эндогенную программу разрешения воспаления и могут способствовать стабилизации атеросклеротической бляшки [45]. Данные исследований показывают, что низкий плазменный уровень ЭПК и ДГК ассоциирован с прогрессированием коронарных бляшек у пациентов, получавших терапию статинами [39].

Особый интерес представляет изучение плейотропных эффектов статинов, связанных с изменением активности ферментов метаболизма жирных кислот (ЖК),

включая стеароил-КоА-десатуразу-1 (SCD1), Δ5-десатуразу (FADS1), Δ6-десатуразу (FADS2) и элонгазы очень длинноцепочечных ЖК 2 (ELOVL2) и 5 (ELOVL5) [46, 134, 208]. Через эти ферментные звенья статины могут изменять биосинтез ЭПК и ДГК и доступность субстратов для образования СПМ [106, 270]. Однако влияние отдельных статинов на разные звенья метаболизма ЖК остаётся недостаточно изученным вследствие ограниченных возможностей существующих аналитических и биомаркерных подходов. Газохроматографическое определение омега-3 индекса в эритроцитах требует сложной пробоподготовки [41], а методы высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) с электрораспылительной ионизацией (ЭРИ) обычно охватывают ограниченный спектр ЖК и не разделяют *цис*- и *транс*-изомеры [124, 191, 249]. Наиболее применяемые в клинической практике омега-3 индекс, соотношение арахидоновой кислоты (АК)/ЭПК и омега-6/омега-3 характеризуют лишь отдельные звенья метаболизма, что ограничивает их применение для комплексной оценки плейотропных эффектов статинов [81, 201]. Также в ретроспективных и амбулаторных исследованиях часто доступна только плазма крови, тогда как омега-3 индекс определяется в эритроцитах [122, 267]. Для его оценки применяются модели пересчёта суммарного плазменного уровня ЭПК и ДГК, однако существующие модели не валидированы для российской популяции [127].

Поэтому необходим комплексный подход, включающий разработку методики профилирования ЖК в крови, валидацию модели пересчёта плазменных данных в эквивалент эритроцитарного омега-3 индекса на российской выборке и создание расчетных индексов на основе профиля ЖК для выявления метаболических сдвигов, сохраняющихся у пациентов с атеросклерозом при терапии статинами. Такой подход расширяет возможности изучения плейотропных эффектов статинов и оценки метаболического ответа на терапию, а также позволяет обосновать перспективные направления персонализации гиполипидемической терапии.

Степень разработанности темы исследования

Концепция омега-3 индекса как биомаркера сердечно-сосудистого риска (ССР), предложенная W.S. Harris и C. von Schacky в 2004 г. [122], получила развитие в крупных исследованиях JELIS [294] и REDUCE-IT [52]. Соотношение ЭПК и АК изучено как независимый биомаркер ССР [204, 294], а его клиническое применение систематизировано в обзорах [201]. Одновременно продолжается поиск новых биомаркеров на основе ЖК, среди которых адреновая кислота (АДК) рассматривается как потенциальная диагностическая и терапевтическая мишень [287]. Однако сравнительная информативность традиционных индексов ЖК для оценки метаболического ответа на терапию статинами остаётся недостаточно изученной.

Для расчета эритроцитарного омега-3 индекса по плазменному содержанию ЭПК и ДГК предложены регрессионные модели [127, 267], однако для российской популяции они не валидированы. Опубликованные методы ВЭЖХ-МС/МС профилирования ЖК охватывают ограниченный перечень ЖК и не обеспечивают разделения *цис*- и *транс*-изомеров [249, 303].

Цель и задачи исследования

Цель исследования: разработка и научное обоснование комплексного методологического подхода к оценке плейотропных эффектов статинов на метаболизм ЖК для стратификации пациентов с атеросклерозом с целью оптимизации гиполипидемической терапии.

Задачи исследования:

1. Разработать и валидировать методику количественного определения ЖК в крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС, обеспечивающую оценку основных звеньев метаболизма ЖК в едином аналитическом цикле для изучения плейотропных эффектов статинов.

2. Разработать и валидировать для российской популяции математическую модель пересчета суммарного содержания ЭПК и ДГК в плазме крови в эквивалент эритроцитарного омега-3 индекса для стандартизованной оценки омега-3 статуса.

3. Установить характер изменений профиля жирных кислот плазмы крови и расчетных индексов активности ферментов десатурации и элонгации (SCD1, FADS1, FADS2, ELOVL2 и ELOVL5) при атеросклерозе брахиоцефальных артерий в зависимости от терапии статинами.

4. Оценить плейотропные эффекты аторвастатина и розувастатина на метаболизм ЖК по расчётным индексам активности ферментов десатурации и элонгации и установить связь исследованных режимов терапии с выраженностью отклонений этих показателей.

5. Сравнить информативность традиционных и новых показателей профиля ЖК для выявления сохраняющихся метаболических сдвигов и изучения метаболического ответа на терапию статинами, а также предложить перспективные направления оптимизации гиполипидемической терапии.

Научная новизна

Впервые разработана и валидирована методика одновременного количественного определения 23 ЖК методом ВЭЖХ-МС/МС с ЭРИ в форме аммонийных аддуктов метиловых эфиров, обеспечивающая разделение *цис*- и *транс*-изомеров C16:1n-7, C18:1n-9 и C18:2n-6 при объёме пробы 40 мкл.

Впервые для российской популяции разработана линейная регрессионная модель с логит-преобразованием для пересчёта суммарного плазменного содержания ЭПК и ДГК в эквивалент эритроцитарного омега-3 индекса (R^2 = 0,782), превосходящая по точности ранее опубликованную модель.

Впервые предложен новый показатель ИБ о-6/о-3 (AUC 0,734–0,780), установлена информативность соотношения C18:0/C18:1n-9, используемого для косвенной оценки активности SCD1 (AUC 0,831–0,858), и разработана

комбинированная логит-модель на основе индексов ЖК (AUC = 0,880) для выявления метаболических сдвигов, сохраняющихся у пациентов с атеросклерозом при терапии статинами.

Впервые показано, что терапия аторвастатином и розувастатином сопровождается снижением информативности традиционных индексов ЖК, тогда как C18:0/C18:1n-9 и ИБ ω-6/ω-3 сохраняют статистически значимую дискриминирующую способность.

Впервые разработана комбинированная логит-модель для, включающая новый показатель ИБ ω-6/ω-3. Модель демонстрирует более высокую AUC, чем отдельные показатели на основе ЖК. Это обосновывает перспективность применения предложенных показателей для оценки метаболического ответа и плейотропных эффектов статинов.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные результаты расширяют представления о плейотропных эффектах статинов на метаболизм ЖК и обосновывают использование профиля ЖК плазмы крови для характеристики метаболических изменений при атеросклерозе на фоне терапии статинами. При этом разработанная методика ВЭЖХ-МС/МС подтвердила свою пригодность в качестве аналитического инструмента для решения данных задач.

Разработанная линейная регрессионная модель с логит-преобразованием позволяет рассчитывать эквивалент эритроцитарного омега-3 индекса по суммарному плазменному содержанию ЭПК и ДГК, что упрощает получение и подготовку биоматериала по сравнению с прямым анализом эритроцитов.

Соотношение C18:0/C18:1n-9, впервые предложенные ИБ ω-6/ω-3 и комбинированная логит-модель формируют методологическую основу для изучения сохраняющихся метаболических сдвигов и метаболического ответа на терапию статинами.

Методология и методы исследования

Методы диссертационного исследования описаны в отечественных и зарубежных научных публикациях, методических рекомендациях по валидации биоаналитических методик и в международном руководстве по представлению результатов исследований прогностических и диагностических моделей (TRIPOD).

В основное сравнительное исследование включены 102 человека: 52 пациента с гемодинамически значимым стенозирующим атеросклерозом брахиоцефальных артерий, которым выполнялась плановая каротидная эндартерэктомия, и 50 лиц контрольной группы. Пациенты с атеросклерозом были ретроспективно стратифицированы в зависимости от терапии статинами: 19 пациентов получали аторвастатин, 21 – розувастатин, 12 – не принимали статины. Для разработки математической модели пересчёта плазменного омега-3 статуса в эквивалент эритроцитарного омега-3 индекса использовали выборку из 69 человек (расширенная выборка, включающая образцы контрольной группы) с парными образцами плазмы крови и эритроцитов.

Исследование проведено в соответствии с этическими принципами Хельсинкской декларации и одобрено Локальным комитетом по этике ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (протокол № 11-26 от 21.05.2026 г.).

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие во всех этапах диссертационного исследования, включая разработку дизайна, постановку цели и задач, определение методологических подходов. Автором лично разработана и валидирована методика количественного определения ЖК в крови методом ВЭЖХ-МС/МС, выполнен статистический анализ полученных данных. Самостоятельно разработаны модель пересчёта плазменного омега-3 статуса в эквивалент эритроцитарного омега-3

индекса, новый показатель ИБ ω-6/ω-3 и комбинированная логит-модель на основе индексов ЖК. Подготовка научных публикаций, написание и оформление диссертации выполнены автором лично.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработанная и валидированная методика ВЭЖХ-МС/МС с ЭРИ обеспечивает одновременное количественное определение 23 ЖК в форме аммонийных аддуктов метиловых эфиров с разделением *цис*- и *транс*-изомеров C16:1n-7, C18:1n-9 и C18:2n-6 и применима для комплексной оценки профиля ЖК крови при изучении плейотропных эффектов статинов.

2. Разработанная математическая модель пересчёта суммарного содержания ЭПК и ДГК в плазме крови в расчетный эквивалент эритроцитарного омега-3 индекса позволяет стандартизованно оценивать омега-3 статус и изучать его как предполагаемый фактор реализации плейотропных эффектов статинов.

3. Терапия аторвастатином и розувастатином у пациентов с атеросклерозом брахиоцефальных артерий ассоциирована с изменениями профиля ЖК плазмы крови и расчетных индексов десатурации и элонгации, используемых для косвенной оценки активности SCD1, FADS1, FADS2, ELOVL2 и ELOVL5. Выявленные особенности профиля ЖК позволяют обсуждать возможные различия плейотропных эффектов отдельных статинов и ограниченное влияние исследованных режимов терапии на выраженность отдельных метаболических сдвигов.

4. У пациентов с атеросклерозом, получающих аторвастатин или розувастатин, соотношение C18:0/C18:1n-9 и впервые предложенный ИБ ω-6/ω-3 сохраняют статистически значимую дискриминирующую способность при сравнении с контрольной группой, в отличие от стандартных показателей омега-3 статуса, АК/ЭПК и омега-6/омега-3. Комбинированная логит-модель демонстрирует наиболее высокую дискриминирующую способность по

результатам ROC-анализа среди исследованных показателей на основе ЖК. Полученные результаты обосновывают перспективность предложенных показателей и модели для изучения сохраняющихся метаболических сдвигов и метаболического ответа на терапию статинами.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационное исследование соответствует паспорту научной специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология, направлениям исследований пунктов 15, 20.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов обеспечена обоснованным выбором дизайна и методов, соответствующих цели и задачам исследования, валидацией биоаналитической методики и применением адекватных методов статистического анализа. Данные ВЭЖХ-МС/МС обработаны в программе MultiQuant 3.0 (Sciex, Канада). Объём основных групп соответствовал результатам априорного расчета мощности, выполненного в программе G*Power 3.1. Статистическую обработку данных проводили в среде R версии 4.4.2 и программе GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, США) с оценкой величины эффектов и доверительных интервалов, учетом множественных сравнений и применением ROC-анализа. Внутреннюю валидацию комбинированной логит-модели выполняли с применением стратифицированной 10-кратной кросс-валидации и 1000 бутстреп-итераций, отбор предикторов – методом LASSO. Согласие расчетных и измеренных значений эритроцитарного омега-3 индекса оценивали методом Бланда–Альтмана. Научные положения и выводы обоснованы результатами исследования, практические рекомендации сформулированы с учетом полученных

результатов и данных литературы. Первичная документация соответствует материалам диссертации.

Результаты и основные положения диссертации доложены и обсуждены на VII и VIII Сеченовских международных биомедицинских саммитах (SIBS-2023; SIBS-2024) (Москва, 2023; 2024 г.), Российском национальном конгрессе кардиологов (Санкт-Петербург, 2024 г.) и XXI научно-практической межрегиональной конференции «БИОМЕДИЦИНА И БИОМОДЕЛИРОВАНИЕ» (Москва, 2025 г.).

Результаты диссертационного исследования внедрены в учебный процесс кафедры фармакологии Института фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) и используются при изучении дисциплины «Фармакология» студентами по направлению подготовки 33.05.01 Фармация (Акт № 965 от 15.05.2026 г.).

Апробация диссертационной работы проведена на заседании кафедры фармакологии Института фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (протокол № 13 от 26 июня 2026 г.).

Публикации по теме диссертации

По результатам исследования автором опубликовано 8 работ, в том числе 4 научных статьи в изданиях, индексируемых в международных базах Web of Science, Scopus, PubMed; 1 научная статья в издании, включенном в базу данных RSCI; 1 иная публикация по теме исследования; 1 свидетельство о государственной регистрации базы данных; 1 публикация в сборнике материалов всероссийской научной конференции.

Структура и объём диссертации

Диссертация изложена на 200 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, экспериментальной части, включающей одну главу собственных исследований, обсуждения полученных результатов и заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений, списка литературы и двух приложений. Работа иллюстрирована 19 рисунками и 26 таблицами (из них 22 таблицы в тексте и 4 таблицы в приложениях). Библиографический список включает 306 источников литературы, из которых 33 отечественных и 273 зарубежных.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Метаболические и воспалительные механизмы развития атеросклероза

Атеросклероз представляет собой хронический прогрессирующий патологический процесс, характеризующийся системным нарушением липидного и энергетического обмена, эндотелиальной дисфункцией и персистирующей воспалительной активацией сосудистой стенки. Современные представления о патогенезе заболевания рассматривают атерогенез как результат сложного взаимодействия метаболических, иммунных и клеточных механизмов, выходящих за рамки простого накопления холестерина (ХС) в артериальной стенке [32].

Основой развития атеросклероза служит накопление атерогенных липопротеинов (в частности ЛПНП) в интиме артерий с их последующей модификацией. Эти изменения сопровождаются активацией эндотелия, повышением экспрессии молекул адгезии и рекрутированием клеток врождённого иммунитета, прежде всего моноцитов, которые дифференцируются в макрофаги и формируют пенистые клетки. Указанные процессы приводят к формированию локального воспалительного очага, поддерживаемого продукцией цитокинов, хемокинов и медиаторов оксидативного стресса [4].

По мере прогрессирования заболевания воспалительный процесс приобретает генерализованный характер, что проявляется активацией системных иммунных механизмов и нарушением метаболической регуляции в различных тканях и органах. В этом контексте атеросклероз рассматривается как одно из клинических проявлений хронического низкоинтенсивного стерильного воспаления, тесно связанного с инсулинорезистентностью, висцеральным ожирением и нарушениями метаболизма ЖК [11].

Важной особенностью атеросклеротического процесса является его метаболическая неоднородность, отражающаяся не только в количественных, но и в качественных изменениях липидного спектра крови. Ряд работ указывает на то, что изменения профиля ЖК, а также баланса между про- и

противовоспалительными липидными гуморальными медиаторами могут играть ключевую роль в поддержании хронического воспаления и прогрессировании заболевания [26].

Системный характер воспалительной активации при атеросклерозе подтверждается возможностью её количественной оценки с использованием интегральных лабораторных показателей, отражающих состояние врождённого иммунного ответа и степень воспалительной нагрузки. Эти показатели коррелируют с наличием и выраженностью атеросклеротического поражения, а также с риском ССС [31].

Следует отметить, что подавление гиперхолестеринемии не всегда сопровождается полной нормализацией воспалительного и метаболического фона. Это обстоятельство подчёркивает наличие остаточной патогенетической активности, сохраняющейся даже на фоне стандартной гиполипидемической терапии, и обосновывает необходимость поиска дополнительных биомаркеров, отражающих состояние воспалительно-метаболических путей [11].

Таким образом, атеросклероз следует рассматривать как многофакторное системное заболевание, в основе которого лежит взаимодействие нарушений липидного обмена, иммуновоспалительных реакций и регуляции метаболизма ЖК.

1.2. Подходы к фармакологической коррекции атеросклероза

Понимание атеросклероза за последние десятилетия претерпело принципиальные изменения. Если ранее его рассматривали преимущественно как заболевание, связанное с нарушением липидного обмена, то в настоящее время признано, что важнейшим фактором атерогенеза является воспаление [171]. Научное сообщество пришло к консенсусу относительно критической роли воспаления в инициации, прогрессировании и дестабилизации атеросклеротических бляшек, что позволяет рассматривать атерогенез не только как метаболическое нарушение, но и как иммуно-воспалительный процесс [1].

В настоящее время атеросклероз прочно рассматривается как хроническое воспалительное заболевание артериальной стенки, при котором как врождённые, так и адаптивные механизмы иммунитета вносят вклад в инициацию и прогрессирование процесса [65, 219]. Это хроническое воспаление присутствует уже на самых ранних этапах формирования патологии [219]. Даже ранние атеросклеротические изменения, такие как жировые полоски (fatty streaks), демонстрируют признаки хронического воспаления [96, 146]. Это хроническое низкоинтенсивное стерильное воспаление, формирующееся вследствие неконтролируемой активации как врождённого, так и адаптивного иммунитета, имеет ключевое значение на всех стадиях атеросклеротического процесса [20].

Признание того, что воспалительные биомаркеры, такие как высокочувствительный С-реактивный белок (вч-СРБ) и интерлейкин-6 (IL-6), способны прогнозировать будущие ССС наряду с традиционными липидными показателями, дополнительно укрепило представление о центральной роли воспаления в атеросклерозе [12].

Считается, что развитие атеросклеротического ССЗ в целом поддерживается персистированием низкоинтенсивного сосудистого воспаления и устойчивой гиперактивацией врождённой иммунной системы [302, 304]. Важную роль в инициации и прогрессировании ССЗ играет низкоинтенсивное персистирующее воспаление, характеризующееся повышением уровней циркулирующих провоспалительных цитокинов – фактора некроза опухоли-альфа (TNF-α), интерлейкина-1β (IL-1β), IL-6, а также вч-СРБ. Эти показатели рассматриваются как независимые факторы риска смертности и заболеваемости [114].

Ключевой механизм, лежащий в основе этого персистирующего воспаления, связан с феноменом «обученного иммунитета» (trained immunity), при котором клетки врождённой иммунной системы после кратковременной стимуляции формируют длительно сохраняющийся провоспалительный фенотип. По данным последних исследований, клетки врождённого иммунитета после короткого воздействия микробиологических продуктов или эндогенных атерогенных стимулов способны приобретать устойчивый провоспалительный фенотип [228,

304]. Неразрешающееся низкоинтенсивное воспаление, опосредованное врождённой иммунной системой, играет центральную роль в патогенезе атеросклероза и связанных с ним ССС. При этом обученный иммунитет рассматривается как один из возможных факторов, поддерживающих персистирующее воспаление, благоприятствующее развитию атеросклероза [302].

Хроническое воспаление особенно усиливается с возрастом и при метаболической дисфункции. По мере старения низкоинтенсивное и длительно сохраняющееся хроническое воспаление, обозначаемое термином «воспалительное старение», усугубляется и в значительной степени повышает риск ССЗ [222]. Ожирение, в частности, накопление эпикардиальной и висцеральной жировой ткани, также способствует системному воспалению, формируя провоспалительную среду, которая ускоряет сосудистое повреждение [222]. Ключевым патогенетическим механизмом атеросклероза, ассоциированного с ожирением, является воспаление жировой ткани, сопровождающееся умеренным системным воспалением, нарушением секреции адипокинов и цитокинов, а также инсулинорезистентностью [30].

Хроническое воспалительное состояние формирует самоподдерживающийся цикл, который способствует дальнейшему прогрессированию атеросклероза. Хроническое воспаление усиливает эндотелиальную дисфункцию, оксидативный стресс и ремоделирование сосудистой стенки, что приводит к повышению жёсткости артерий и формированию бляшек. Дисрегуляция иммунных клеток, особенно макрофагов, поддерживает провоспалительную среду в артериальной стенке [278]. Такая среда облегчает накопление липидов, аутоантител и аутоантигенов и тем самым дополнительно усиливает воспалительный ответ. При этом выраженность воспаления коррелирует с повышенным риском неблагоприятных ССС [278].

Хроническое неразрешающееся воспаление является одной из ключевых характеристик атеросклероза, при этом дефектные механизмы разрешения воспаления способствуют персистированию заболевания. В атеросклеротических бляшках отмечаются признаки клеточного старения, а хроническое неразрешающееся воспаление рассматривается как их важнейшая особенность.

Показано, что уровни СПМ, особенно резолвина D1, а также соотношение этих медиаторов к провоспалительному лейкотриену B4, существенно снижены в зонах уязвимых бляшек [223]. Атеросклероз можно характеризовать как самостоятельную форму воспаления, которая имеет сходство, но также и принципиальные отличия от низкоинтенсивного воспаления и различных вариантов канонического воспаления. При этом жизнеугрожающие осложнения атеросклероза связывают с развитием острой системной гипервоспалительной реакции [116].

Целенаправленное воздействие на факторы риска ССЗ частично снижает риск развития воспалительных процессов в сосудах. Однако некоторые воспалительные процессы остаются незатронутыми обычными методами лечения. На фоне персистирующего низкоинтенсивного воспаления, даже при успешной фармакотерапии гиполипидемическими препаратами, у многих пациентов сохраняется так называемый ОВР [214, 239].

Наиболее распространённое клиническое определение рассматривает ОВР как наличие уровня вч-СРБ более 2 мг/л при одновременном поддержании показателей ХС ЛПНП ниже целевых пороговых значений [177, 276]. Более конкретно, во многих исследованиях они определяются ниже 70 мг/дл (1,8 ммоль/л) при сохранении вч-СРБ на уровне 2 мг/л и выше [85].

Распространённость данного состояния среди пациентов, получающих стандартную гиполипидемическую терапию, является значительной. Среди пациентов со стабильной ишемической болезнью сердца, достигших уровня ХС ЛПНП ниже 70 мг/дл, примерно у 30 % сохраняются повышенные значения вч-СРБ, что указывает на сохраняющийся ОВР [63, 104, 214]. Данный факт указывает на необходимость учёта воспалительного компонента патогенеза атеросклероза при оценке остаточного риска осложнений [29].

Практическая значимость оценки ОВР (наличия низкоинтенсивного воспаления) обусловлена тем, что воспаление вовлечено во все стадии атеротромбоза – от прогрессирования атеросклеротической бляшки до её дестабилизации и развития тромботических осложнений. В условиях сохраняющейся воспалительной активности даже адекватный контроль липидных

показателей может быть недостаточным для оптимального снижения частоты неблагоприятных исходов. В связи с этим оценка воспалительного компонента рассматривается как инструмент стратификации риска, позволяющий выделять группы пациентов с повышенной вероятностью осложнений и потенциальной потребностью в дополнительных вмешательствах, направленных на снижение воспалительной активности [20].

Клинические исследования последовательно демонстрируют прогностическую значимость ОВР в различных популяциях пациентов. Больные с сохраняющимся высоким ОВР имели существенно более высокую общую смертность (2,6 % против 0,7 %) и более высокую частоту инфаркта миокарда (7,5 % против 4,3 %) при наблюдении в течение одного года по сравнению с пациентами с низким ОВР [72, 143]. Прогностическая ценность этого показателя выходит за рамки ишемической болезни сердца, поскольку ОВР также может предсказывать неблагоприятные исходы у пациентов с легкой формой ишемического инсультом [296].

С фармакологической точки зрения концепция персистирующего низкоинтенсивного воспаления при атеросклерозе формирует представление о наличии дополнительной патогенетической мишени, не полностью затрагиваемой стандартной гиполипидемической терапией. Одним из факторов, способных влиять на воспалительно-метаболические механизмы атеросклероза, являются омега-3 ПНЖК. Их биологическое действие включает снижение уровня триглицеридов (ТГ), модуляцию продукции провоспалительных цитокинов, улучшение эндотелиальной функции, а также образование СПМ, что потенциально способствует снижению системной воспалительной нагрузки и воздействию на компоненты ОВР, не устраняемые только снижением ЛПНП [44].

Терапевтический потенциал модификации профиля ЖК для снижения ОВР приобрёл значимую клиническую актуальность, при этом несколько подходов демонстрируют многообещающие результаты при различных заболеваниях. Омега-3 ПНЖК, прежде всего ЭПК, показывают выраженные терапевтические преимущества в защите сердечно-сосудистой системы и могут играть важную роль в снижении частоты ССС [132].

Противовоспалительные диетические стратегии представляют собой особенно практичный терапевтический подход. Диетические вмешательства, включающие увеличение доли противовоспалительных продуктов в сочетании со снижением потребления провоспалительных продуктов, демонстрируют эффективность в профилактике субклинического воспаления и ассоциируются со значимыми метаболическими и микробиологическими изменениями. Так, потребление противовоспалительных рационов, богатых омега-3 ЖК, связывают с изменениями кишечной микробиоты и снижением субклинического воспаления у пациентов с воспалительными заболеваниями [147, 291]. Кроме того, иммуномодулирующие эффекты ПНЖК омега-3 и омега-6, которые снижают уровни нескольких воспалительных биомаркеров в организме, поддерживают их дальнейшее изучение в качестве потенциальных терапевтических агентов [165, 216, 301].

Клинические обзоры и результаты исследований указывают на возможность использования омега-3 ПНЖК в качестве элемента комплексной коррекции дислипидемии и воспалительного фона, включая снижение уровня ТГ и смещение профиля липидных медиаторов в сторону менее провоспалительного, что теоретически благоприятно для снижения ОВР. В то же время интерпретация клинических результатов требует осторожности ввиду неоднородности данных о влиянии омега-3 добавок на исходы ССС, что отражено в современных рекомендациях и обзорах [21].

Таким образом, фармакологическое значение концепции персистирующего низкоинтенсивного воспаления и соответствующего ОВР заключается в том, что оптимизация вторичной профилактики атеросклеротических заболеваний должна учитывать не только достижение целевых уровней ЛПНП, но и степень сохраняющейся воспалительной активности. Выявление ОВР обосновывает необходимость комплексного подхода к терапии, включающего немедикаментозные стратегии (в том числе диетические подходы с включением омега-3 ПНЖК) и иные вмешательства, направленные на снижение системной воспалительной нагрузки у пациентов высокого риска. Дополнительно данная концепция формирует

теоретическую основу для дальнейшего анализа метаболических изменений, ассоциированных с воспалительной активностью и патогенезом атеросклероза [29].

1.3. Роль жирных кислот в патогенезе атеросклероза

ЖК в патогенезе атеросклероза выступают не только как энергетические субстраты и структурные компоненты мембран, но и как регуляторы воспалительных и иммунных реакций, липопротеинового обмена и активности ферментных систем сосудистой стенки. Их качественный состав влияет на физико-химические свойства мембран (включая организацию липидных рафтов), интенсивность окислительного стресса, экспрессию молекул адгезии и профиль липидных медиаторов воспаления, что напрямую связывает липидный метаболизм с концепцией персистирующего низкоинтенсивного воспаления [33].

НЖК, прежде всего пальмитиновая (C16:0) и стеариновая (C18:0), рассматриваются как фактор, потенциально связанный с атерогенезом по двум направлениям. Во-первых, при определённых моделях питания повышение доли НЖК ассоциируется с формированием менее благоприятного липопротеинового профиля, включая увеличение ХС ЛПНП. Во-вторых, свободные НЖК способны индуцировать провоспалительную активацию клеток через механизмы врождённого иммунитета, включая сигнальные пути, опосредованные Toll-подобными рецепторами (TLR2/4), с последующей активацией транскрипционных программ воспалительного ответа. Экспериментальные данные и обзорные работы указывают на связь НЖК с усилением TLR4-опосредованной сигнализации; при этом обсуждаются ограничения и неоднозначность молекулярных механизмов активации TLR, что требует осторожной интерпретации и допускает рассмотрение эффекта НЖК как компонента комплексной провоспалительной стимуляции в сочетании с другими метаболическими факторами [130].

На тканевом уровне НЖК способствуют дисфункции эндотелия и поддержанию хронического воспалительного фона, что повышает вероятность прогрессирования атеросклеротической бляшки [152].

Омега-9 МНЖК, главным образом олеиновая кислота (C18:1n-9), традиционно рассматриваются как менее атерогенная альтернатива насыщенным жирам в питании. Совокупность данных систематических обзоров и мета-анализов указывает, что увеличение доли МНЖК (особенно при замене ими насыщенных жиров) в среднем связано с более благоприятными показателями ССР [246].

Олеиновая кислота может играть как благоприятную, так и неблагоприятную роль в липидном обмене, в зависимости от условий. Она способна поддерживать здоровую регуляцию липидов, способствуя выведению ХС из клеток, повышая образование липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) и снижая окислительный стресс. Эти эффекты рассматриваются как защитные в отношении развития атеросклероза [217]. Однако, когда олеиновая кислота производится в организме в больших количествах из-за повышенной активности фермента SCD1, это связано с рядом вредных последствий. Повышенная активность SCD1 связана с жировой дистрофией печени и хроническим воспалением низкой интенсивности, особенно у людей с высоким потреблением калорий и инсулинорезистентностью [182, 217].

Поэтому важно различать пищевое поступление МНЖК и эндогенное повышение отдельных МНЖК (например, вследствие усиленного липогенеза и Δ9-десатурации): биологический смысл этих ситуаций различается, а интерпретация профиля МНЖК требует учёта метаболического контекста. Это особенно актуально при биомаркерном подходе, когда повышенная доля отдельных МНЖК в крови может отражать не «защитное» действие омега-9, а метаболическую перестройку (инсулинорезистентность, гипертриглицеридемия и др.) [98].

Наконец, данные липидомных исследований подчёркивают, что олеиновая кислота является одной из доминирующих ЖК в кровотоке и одновременно активно представлена в составе атеросклеротических поражений, что согласуется с представлением о динамическом обмене ЖК между циркулирующими липидами и сосудистой стенкой [25, 169].

Омега-6 ПНЖК имеют двойственную роль в воспалительных процессах: АК (C20:4n-6) служит предшественником ряда эйкозаноидов с провоспалительными и протромботическими эффектами, тогда как линолевая кислота (C18:2n-6) является

незаменимой, участвует в поддержании мембранных свойств и при замене насыщенных жиров в рационе способна улучшать липопротеиновый профиль. В современных обзорах показано, что увеличение потребления/уровней линолевой кислоты в типичном диапазоне рационов не обязательно сопровождается ростом системных маркеров воспаления; напротив, в ряде популяционных и клинических данных более высокие уровни линолевой кислоты ассоциированы с более благоприятными кардиометаболическими исходами [131, 136].

Следовательно, при обсуждении омега-6 ПНЖК в контексте атеросклероза принципиально важно разделять: роль арахидонат-зависимых медиаторных каскадов в сосудистом воспалении и тромбозе и эффект замещения насыщенных жиров линолевой кислотой на липидный профиль и риск [131].

Омега-3 ПНЖК, прежде всего ЭПК и ДГК, занимают особое место как модификаторы воспаления и структуры мембран. Их биологические эффекты включают частичное торможение образования провоспалительных эйкозаноидов из АК, снижение экспрессии молекул адгезии и хемотаксиса лейкоцитов, а также образование СПМ, что функционально связывает омега-3 статус с величиной системной воспалительной нагрузки [68].

ЭПК конкурентно взаимодействует с АК за ключевые ферменты циклооксигеназного и липоксигеназного путей, способствуя образованию менее провоспалительных продуктов; в связи с этим соотношение ЭПК/АК рассматривается как потенциальный маркёр хронического воспаления [201]. Омега-3 ЖК также служат предшественниками СПМ – резолвинов, протектинов и марезинов, которые активно способствуют завершению воспалительной реакции, а не только подавляют её [43, 103]. Эти медиаторы отражают принципиальный сдвиг в понимании контроля воспаления, подразумевающий не просто блокирование провоспалительных сигналов, а активную координацию возврата организма к гомеостазу [253].

Омега-3 ЖК также модулируют воспаление, изменяя активность ключевых сигнальных путей, включая пути ядерного фактора κB (NF-κB) и митоген-активируемых протеинкиназ (MAPK), которые регулируют экспрессию основных

медиаторов воспаления, таких как TNF-α, IL-6 и вч-СРБ [237]. Кроме того, эти ЖК встраиваются в мембраны иммунных клеток, где влияют на текучесть мембран и, как следствие, на последующую продукцию липидных медиаторов [43].

Клиническая значимость этих механизмов подчёркивается данными о том, что генетические полиморфизмы в генах метаболизма ЖК (*FADS1, FADS2* и *CYP4F3*) могут влиять на эффективность превращения омега-3 ЖК в противовоспалительные резолвины и протектины [247]. Это позволяет предположить, что часть людей может быть более предрасположена к хроническим воспалительным заболеваниям вследствие нарушенной работы путей метаболизма ЖК.

Показано, что как омега-3, так и омега-6 ПНЖК могут иметь отрицательные корреляции с системными индексами воспаления и снижать уровни ряда воспалительных биомаркеров [165]. Например, увеличение потребления ПНЖК связано со снижением концентраций IL-1β [176].

Клинически важным является то, что недостаточность омега-3 статуса может быть ассоциирована с прогрессированием коронарного атеросклероза даже при эффективном контроле ХС ЛПНП на фоне терапии статинами. В исследовании с количественной оценкой коронарной атеросклеротической бляшки показано, что у пациентов на терапии статинами при среднем ХС ЛПНП < 80 мг/дл низкий «плазменный омега-3 индекс» (доля ЭПК+ДГК; порог < 3,43 %) был независимым предиктором прогрессирования бляшки, тогда как достижение уровня ≥ 4 % ассоциировалось с предотвращением прогрессирования коронарной бляшки. Этот результат поддерживает концепцию, согласно которой воспалительно-метаболические механизмы, связанные с дефицитом омега-3 ПНЖК, могут формировать компонент ОВР, слабо чувствительный к изолированному снижению ХС ЛПНП [39].

Для практической интерпретации омега-3 статуса используется, в частности, омега-3 индекс как суммарное содержание ЭПК и ДГК в мембранах эритроцитов. В клинических обзорах обсуждаются ориентировочные диапазоны (< 4 %, 4–8 %, > 8 %) как уровни, соотносимые с различным риском развития ССЗ [9].

Таким образом, омега-3 статус является не только «диетическим» параметром, но и потенциальным интегральным маркером метаболико-воспалительной составляющей атеросклероза и вариабельности ответа на вторичную профилактику.

Совокупность данных об участии НЖК в провоспалительной сигнализации, о контекст-зависимой роли омега-9 МНЖК, о необходимости корректной трактовки омега-6 ПНЖК и о клинической значимости омега-3 статуса (включая риск прогрессирования атеросклероза при низком омега-3 индексе на фоне терапии статинами) формирует логическую основу для дальнейшего изучения профиля ЖК в качестве ключевого фактора патогенеза атеросклероза.

1.4. Плейотропные эффекты статинов и метаболизм жирных кислот

Терапия статинами рассматривается как базовый подход к лечению и профилактике атеросклеротических заболеваний за счёт ингибирования ГМГ-КоА-редуктазы, снижения внутрипечёночного синтеза ХС и последующей активации клиренса атерогенных липопротеинов. Вместе с тем клинически значимые эффекты статинов не исчерпываются уменьшением ХС ЛПНП: показано воздействие на эндотелиальную функцию, воспалительную активность сосудистой стенки, окислительный стресс, тромбогенность и стабильность атеросклеротической бляшки [19, 22, 208].

Ключевым биохимическим основанием плейотропных эффектов считается блокада мевалонатного пути с уменьшением образования изопреноидных интермедиатов (в частности, фарнезил- и геранилгеранил-производных), необходимых для посттрансляционного пренилирования малых GTP-связывающих белков (Rho, Rac и др.). Это приводит к ослаблению сигнальных каскадов, поддерживающих эндотелиальную дисфункцию, воспалительную активацию и прооксидантные реакции. В обзорах подчёркивается, что именно ингибирование пренилирования и связанных с ним Rho/ROCK- и Rac/NADPH-оксидазных путей лежит в основе части сосудистых эффектов, которые могут

проявляться относительно быстро и не всегда линейно коррелируют с величиной снижения ХС ЛПНП [166, 208].

Противовоспалительный компонент терапии статинами реализуется через уменьшение экспрессии молекул адгезии, ослабление трансэндотелиальной миграции лейкоцитов и снижение продукции провоспалительных медиаторов в сосудистой стенке, что клинически соответствует снижению системной воспалительной активности. Это принципиально важно в контексте ОВР, когда при достижении целевых уровней ХС ЛПНП сохраняются признаки воспаления и, как следствие, неблагоприятный прогноз [208].

Параллельно описывается эндотелиопротективное действие статинов: повышение биодоступности оксида азота и улучшение функциональных показателей сосудистой стенки, включая параметры жёсткости артерий и маркеры эндотелиальной дисфункции [6, 28].

Также к фармакологическим эффектам статинов относят стабилизацию атеросклеротической бляшки и снижение тромбогенного потенциала: уменьшение воспалительной инфильтрации и активности металлопротеиназ, снижение окислительного повреждения и подавление проагрегантных/прокоагулянтных сдвигов. В совокупности это формирует влияние статинов на качественные характеристики атеросклеротического процесса (уязвимость бляшки, эндотелиальная дисфункция, воспалительная активность), то есть на те звенья патогенеза, которые не отражаются напрямую концентрацией ХС ЛПНП [3, 208].

Терапия статинами способна модифицировать обмен ЖК за счёт влияния на печёночные этапы формирования и последующего катаболизма ТГ-богатых липопротеинов. Ингибирование ГМГ-КоА-редуктазы уменьшает доступность внутрипечёночного «специфического пула» ХС, используемого для формирования поверхностного монослоя липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП), включающего фосфолипиды и неэтерифицированный ХС. При снижении доли неэтерифицированного ХС повышается восприимчивость частиц ЛПОНП к действию липопротеинлипазы, что сопровождается ускорением гидролиза ТГ и последующих превращений ЛПОНП (с образованием ремнантов и изменением их

клиренса тканями). В результате изменяются условия транспорта и утилизации липопротеин-связанных ЖК в периферических тканях и их распределение между кровью и клетками, что рассматривается как эффект терапии статинами, выходящий за рамки изолированного снижения ХС ЛПНП [27].

На клеточном уровне потенциально значимы эффекты статинов на регуляцию путей окисления и десатурации ЖК. В частности, обсуждается влияние на активность ферментных звеньев, определяющих соотношение НЖК и МНЖК (через изменения активности/экспрессии десатураз), а также на метаболический выбор субстрата для митохондриального β-окисления. Это важно по двум причинам. Во-первых, такие сдвиги теоретически способны модифицировать индексы ЖК (например, отношения «продукт/предшественник»), используемые как приближённые маркеры активности десатураз и элонгаз. Во-вторых, обсуждаемое влияние терапии статинами на чувствительность к инсулину и риск нарушений углеводного обмена биохимически обусловлено метаболизмом ЖК и энергетическим обеспечением тканей [14, 27].

Связь терапии статинами с инсулинорезистентностью объясняется преимущественно субстратно-энергетическими механизмами в инсулин-зависимых тканях (прежде всего в скелетных мышцах) в постпрандиальный период. В норме инсулин способствует формированию более «эффективного» варианта энергетики мышечной ткани, при котором клетка преимущественно окисляет олеиновую кислоту. На фоне статинов усиливается клеточное поглощение ЛПОНП, но при этом сохраняется значимая доля пальмитин-содержащих ТГ, которые гидролизуются медленнее; дополнительно обсуждается ингибирование десатурации (SCD1) и отсутствие индукции пероксисомального окисления. В результате формируется «пальмитиновый» вариант метаболизма, при котором скорость образования доступных неэтерифицированных ЖК и ацетил-КоА для митохондриального β-окисления оказывается недостаточной для оптимального синтеза аденозинтрифосфата. Возникающий энергетический дефицит, в трактовке автора, компенсируется усилением липолиза в жировой ткани и повышением уровня циркулирующих неэтерифицированных ЖК, которые

начинают интенсивно захватываться инсулин-зависимой мышечной тканью. Рост поступления ЖК в мышцы сопровождается подавлением окисления глюкозы в митохондриях («переключение» субстратов), что приводит к снижению утилизации глюкозы тканями, гипергликемии и формированию фенотипа инсулинорезистентности. Таким образом, предполагаемая связь статинов с инсулинорезистентностью опосредована не прямым влиянием на рецептор инсулина, а перераспределением потоков ЖК и субстратным переключением энергетики инсулин-зависимых тканей [27].

Терапия статинами влияет на метаболизм ЖК через два ключевых транскрипционных фактора: стерол-регулирующий элемент-связывающий белок 1c (SREBP-1c), регулирующий баланс их синтеза *de novo*, и рецептор, активируемый пероксисомным пролифератором альфа (PPAR-α), отвечающий за утилизацию и окисление ЖК. На фоне дефицита внутриклеточного ХС, индуцированного ингибированием ГМГ-КоА-редуктазы, активируется сигнальный путь SCAP (белок-активатор расщепления SREBP) / SREBP (стерол-регулирующий элемент-связывающий белок), преимущественно его изоформа SREBP-2. Это обусловливает компенсаторное повышение экспрессии генов, участвующих в регуляции гомеостаза ХС, в том числе гена *LDLR*, кодирующего рецептор ЛПНП, и гена *PCSK9*, кодирующего пропротеиновую конвертазу субтилизин-кексинового типа 9 (PCSK9) [174]. Одновременно SREBP-2 функционально связан с экспрессией SREBP-1c: показано, что транскрипционная программа SREBP-2 может быть необходимым условием для полноценной экспрессии SREBP-1c в печени [234]. Поскольку SREBP-1c является центральным транскрипционным фактором, контролирующим липогенез (активация ацетил-КоА-карбоксилазы, синтазы жирных кислот FASN, SCD1), его усиление в ряде моделей рассматривают как механизм повышения *de novo* липогенеза и накопления липидов при длительном воздействии статинов [128]. При этом направление эффекта не является универсальным: в некоторых моделях метаболических нарушений терапия отдельными статинами сопровождалась снижением экспрессии SREBP-1c и улучшением показателей инсулинорезистентности/стеатоза, что подчёркивает

зависимость результата от исходного метаболического контекста, дозы и конкретного препарата [102].

Параллельный эффект связан с PPAR-α – ключевым регулятором печёночного захвата и β-окисления ЖК (митохондриального и пероксисомального). Для статинов показана способность увеличивать транскрипцию PPAR-α: в клеточной модели (HepG2) большинство статинов активировали промотор PPAR-α и повышали уровень матричных рибонуклеиновых кислот (мРНК)/ядерного белка и транскрипционную активность PPAR-α [248]. В эксперименте *in vivo* аторвастатин предотвращал снижение экспрессии PPAR-α на фоне фруктозной нагрузки и сопровождался уменьшением печёночных ТГ и плазменных неэтерифицированных ЖК [233]. Функционально это согласуется с тем, что часть эффектов статинов на ТГ и метаболизм ЖК может реализовываться через PPAR-α-зависимые гены транспорта и утилизации ЖК. В частности, для печеночного белка, связывающего ЖК (L-FABP), показана PPAR-α-зависимая индукция при воздействии статинов [155]. На уровне фенотипа в ряде моделей терапия статинами ассоциировалась с усилением путей митохондриального и пероксисомального окисления ЖК в печени и снижением проявлений стеатогепатита [211].

PPAR-α активируется длинноцепочечными омега-3 ЖК, в частности, ЭПК и ДГК. Он играет важную роль в регуляции генов, связанных с образованием ПНЖК, регулирует активность/экспрессию десатураз ЖК FADS1 и FADS2, а также элонгаз (ELOVL2/ELOVL5) [232, 306]. СПМ, относящиеся к производным омега-3 ЖК, такие как резолвины, протектины и марезины, обеспечивают активное разрешение воспаления [254]. Результаты исследований позволяют предположить, что статины способны модулировать биологию СПМ и сигнальные пути разрешения воспаления, так как они напрямую влияют на метаболизм их предшественников (омега-3 и омега-6 ЖК) [221]. Клинические исследования свидетельствуют, что добавление высокоочищенного ЭПК (икосапент этил) к терапии статинами снижает частоту ССС. Однако влияние на уровни воспалительных биомаркеров и результаты для других форм омега-3 препаратов менее однозначны [57]. В совокупности данные исследований позволяют предположить, что омега-3

добавки, особенно лицам с низкими исходными уровнями омега-3, целесообразно рассматривать как дополнение к терапии статинами с целью минимизации ОВР [125, 203].

Также терапия статинами может влиять на метаболизм МНЖК за счёт снижения активности SREBP-1c, который регулирует экспрессию SCD1. Этот фермент отвечает за превращение НЖК, таких как стеариновая кислота (C18:0), в МНЖК олеиновую кислоту (C18:1n-9) [46]. В экспериментальной модели неалкогольной жировой болезни печени у мышей розувастатин снижал мРНК-экспрессию SREBP-1c и фермента-мишени синтазы ЖК FASN, что согласуется с подавлением липогенного пути в печени, при этом мРНК-экспрессия SCD1 в той же работе статистически значимо не изменялась [293].

В исследовании на крысах аторвастатин и симвастатин изменяли расчётные индексы SCD1, причём характер изменений зависел от препарата и режима питания. Повышение соотношения 18:1/18:0 выявлялось при применении симвастатина на стандартном рационе и аторвастатина в условиях выраженной экспериментальной гипергомоцистеинемии [203]. Эти результаты указывают на возможность фармакологической модуляции соотношений ЖК, используемых для косвенной оценки активности SCD1.

С практической точки зрения это означает, что интерпретация профиля ЖК и расчетных индексов у пациентов, получающих терапию статинами, должна учитывать возможный вклад лекарственного воздействия в наблюдаемые изменения липидома. Это создаёт методологическую основу для выделения значимых маркеров, которые отражают не только снижение ХС ЛПНП, но и плейотропные эффекты статинов, включая сдвиги в составе ЖК [208].

1.5. Современные маркеры на основе жирных кислот

Мониторинг биологических соединений, участвующих в развитии атеросклероза или подверженных метаболическому влиянию сопутствующих

патофизиологических процессов, может обеспечить ценные прогностические биомаркеры для скрининга и раннего выявления атеросклероза или оценки риска его развития [16, 62].

Достижения в понимании молекулярных механизмов атеросклероза подчеркнули центральную роль липидного обмена в поддержании воспаления сосудов и нестабильности бляшек. Это привело к поиску новых диагностических подходов, которые могут помочь эффективно контролировать терапевтический ответ [15, 16, 40, 298]. Среди биомаркеров, связанных с липидами, значительное внимание привлекают ЖК, поскольку они напрямую влияют на воспаление, функцию эндотелия и липидный обмен, которые являются ключевыми процессами в патогенезе атеросклероза [16, 24, 152]. Состав ЖК можно измерить в плазме, сыворотке или мембранах эритроцитов, что позволяет оценить как недавнее потребление с пищей, так и долгосрочный статус потребления ЖК [108].

Многочисленные исследования показали, что специфические индексы, полученные из соотношений или комбинаций отдельных ЖК, служат мощными предикторами ССС и прогрессирования атеросклероза [81]. Например, индексы десатурации и элонгации – расчетные отношения предшественник/продукт (или продукт/предшественник), используемые как приближённые маркеры активности соответствующих ферментов в метаболизме ЖК. Их ключевое преимущество – возможность реконструировать направление метаболических потоков (липогенез *de novo*, десатурация, удлинение цепи) в условиях, когда прямое измерение ферментной активности недоступно в клиническом материале. В работах, где используется подход расчетных индексов, прямо указано, что индексы выражают как соотношение концентраций определённых ЖК и применяют для оценки относительной активности отдельных десатураз и элонгаз [5].

Диагностическая ценность подобных индексов заключается в способности отражать взаимодействие между пищевыми привычками, метаболизмом, воспалением и здоровьем сосудов. Длительные проспективные исследования подтвердили клиническую значимость профилирования ЖК для прогнозирования ССР [185]. В этом контексте значительное внимание привлекают ПНЖК, включая

омега-3 и омега-6. Они выполняют роль как незаменимых нутриентов (питательных веществ), так и модуляторов воспалительных процессов [23, 37].

Омега-3 ЖК, такие как ЭПК и ДГК, влияют на липидный профиль и служат предшественниками СПМ, которые способствуют устранению воспаления [88, 170]. За счёт механизмов, таких как уменьшение инфильтрации лейкоцитами и снижение выработки цитокинов, СПМ поддерживают сосудистый гомеостаз и способствуют стабилизации атеросклеротической бляшки [76, 221].

К клинически значимым и широко используемым биомаркерам относятся несколько устоявшихся индексов, включая Омега-3 статус (суммарное содержание ЭПК и ДГК), отношение АК/ЭПК и различные отношения омега-6 к омега-3 [81, 87]. Омега-3 статус может оцениваться с использованием «Омега-3 индекса», определяемого как доля ЭПК и ДГК в мембранах эритроцитов, что ассоциировано с кардиопротекторным эффектом. Значения ≥ 8 % соответствуют наименьшему ССР, тогда как значения ≤ 4 % идентифицируют лиц с повышенным риском [13, 120, 173, 210, 259]. Отношение АК к ЭПК (АК/ЭПК) также валидировано как маркер атеросклеротического риска, поскольку более высокие значения АК/ЭПК отражают сдвиг в сторону более провоспалительного состояния [134, 135, 277]. Отношения омега-6 к омега-3 ЖК также широко изучались, хотя их клиническая полезность остаётся предметом дискуссии [111, 259]. Клиническое исследование липидной интервенции с ЭПК, проведенное в Японии (Japan EPA Lipid Intervention Study, JELIS), продемонстрировало, что добавки ЭПК у пациентов, получающих статины, снижают количество серьезных коронарных событий на 19 процентов, и определило соотношение АК/ЭПК как независимый предиктор будущих ССС [294].

Хотя в прошлом основное внимание в области сердечно-сосудистых биомаркеров на основе ЖК уделялось ПНЖК, в настоящее время интерес расширился и охватил МНЖК, в частности, олеиновую кислоту (C18:1n−9) [160]. МНЖК являются основными компонентами пищевых жиров и синтезируются эндогенно из НЖК под действием SCD1 [46]. Изменения в активности этого фермента, которые могут отражаться в соотношении стеариновой и олеиновой

кислот (C18:0 к C18:1n−9), связаны с метаболическим здоровьем, чувствительностью к инсулину и изменениями в содержании липидов в тканях [172, 182, 217]. Эпидемиологические данные указывают на то, что более высокое потребление НЖК связано с повышенной смертностью от ишемической болезни сердца, в то время как потребление МНЖК демонстрирует обратную зависимость [185]. Эти результаты подтверждают потенциальную ценность соотношения НЖК к МНЖК в качестве биомаркера питания и метаболизма [186]. Тем не менее, исследования, рассматривающие МНЖК как потенциальные биомаркеры состояния сердечно-сосудистой системы, дают противоречивые результаты, что подчёркивает необходимость дальнейшего изучения [56, 160].

Помимо вышеупомянутых, в литературе встречаются следующие индексы [5]:

1) индексы Δ9-десатуразы (SCD1), связанной с образованием МНЖК из НЖК: 16:0/16:1n-7 и описанный выше C18:0/C18:1n−9;

2) различные варианты отношений, отражающих метаболизм в омега-6 пути, например, FADS1 (Δ5-десатураза) 20:3n-6/20:4n-6;

3) индексы элонгации, например, 16:0/18:0 (ELOVL6) – удлинение ННЖК.

Таким образом, индексы десатурации/элонгации – не самостоятельные диагностические показатели, а инструменты метаболической интерпретации, чувствительные к влиянию рациона, лекарственной терапии (в т.ч. статинами), инсулинорезистентности и генетических факторов [18].

1.6. Современные методологические подходы к аналитической оценке жирных кислот и их ограничения в фармакологических исследованиях

Оценка содержания ЖК в клинических и клинико-экспериментальных исследованиях направлена на решение двух задач: первая – количественное описание профиля ЖК в биологической матрице как характеристики метаболического статуса, и вторая – выявление изменений профиля на фоне вмешательства (лекарственная терапия, нутритивная коррекция, комбинированные стратегии), включая расчет интегральных показателей (омега-3 индекс,

соотношение омега-6/омега-3, индексы десатурации и элонгации). Достоверность выводов в таких исследованиях определяется преаналитическим этапом, выбором матрицы и стандартизованной процедурой количественного измерения (калибровка, внутренние стандарты, контроль качества (КК) по уровням), поскольку систематические ошибки пробоподготовки и измерения приводят к искажению долевого состава ЖК и производных индексов [10].

Важным фактором при оценке биомаркеров ЖК является выбор биологической матрицы для измерения. Диагностическая эффективность «Омега-3 индекса», отношения АК/ЭПК и отношения омега-6 к омега-3 различается при анализе плазмы, сыворотки и эритроцитов, поскольку эти фракции крови характеризуются различной динамикой обновления [119, 259]. Плазма и сыворотка в большей степени отражают краткосрочное поступление ЖК (в т.ч. питание и постпрандиальные колебания) с периодом полувыведения порядка 5-10 суток, тогда как эритроциты интегрируют пищевые и метаболические влияния на протяжении примерно от 1 до 4 месяцев [162]. Аналитические методы, включая подготовку образцов и способ выражения концентрации ЖК, дополнительно влияют на интерпретацию результатов по различным фракциям крови [250, 275]. Несмотря на эти различия, пропорциональные изменения в составных показателях, таких как индекс омега-3 и соотношение омега-6 к омега-3, наблюдались во всех матрицах во время приема добавок омега-3, что подтверждает их надежность в качестве биомаркеров [84].

В большинстве современных публикаций, посвящённых определению омега-3 индекса в эритроцитах, предлагается использовать газовую хроматографию (ГХ) с детектированием пламенно-ионизационным детектором и масс-спектрометрическим детектированием (МС) [34, 38, 41, 90, 109, 121, 133, 151]. ГХ в целом считается предпочтительным методом анализа ЖК благодаря относительно короткому времени анализа и хорошей форме хроматографических пиков.

Масс-спектрометрия с электрораспылительной ионизацией – это чувствительный и универсальный метод, который широко применяется для анализа большинства соединений. Хотя ВЭЖХ-МС/МС с использованием ЭРИ широко используется в липидомике, ЖК при таком подходе ионизируются недостаточно

эффективно, что приводит к низкой чувствительности [299]. В связи с этим в современных ВЭЖХ-МС/МС методах широко применяют дериватизацию, направленную на повышение ионизационной эффективности и стандартизацию аналитического отклика [158]. Применимость ВЭЖХ-МС/МС показана также для определения алкиловых эфиров ЖК: методом ВЭЖХ-МС/МС определяли этиловые эфиры насыщенных и ненасыщенных ЖК, включая производные C14:0, C16:0, C18:0, C18:1, C18:2 и C20:4 [285].

Предыдущие исследования доказали эффективность метода метилирования при профилировании ЖК (в виде метиловых эфиров ЖК, МЭЖК) в тканях и органах, что приводит к увеличению числа идентифицированных соединений по сравнению с подходом без метилирования [191]. Анализ в форме МЭЖК повышает чувствительность метода ВЭЖХ-МС/МС и позволяет одновременно определять ДГК, ЭПК, АК, линолевую кислоту (C18:2n-6) и другие преобладающие ЖК вместе с минорными ЖК, такими как C14:0, C20:0, C22:0, C24:0, C18:3n-6, C20:2n-6 и *транс*-изомеры ЖК, концентрации которых в мембранах эритроцитов могут быть до 2 порядков ниже [138, 191, 268].

Воспроизводимость, сравнительно короткое время анализа и высокая специфичность, обусловленная применением тандемного масс-спектрометрического детектирования, являются наиболее значимыми преимуществами систем ВЭЖХ-МС/МС [109]. В то же время число публикаций, описывающих ВЭЖХ-МС/МС профилирование ЖК в крови, остаётся ограниченным, а методические решения с разделением *цис*- и *транс*-изомеров в режиме ЭРИ встречаются единично, что сужает возможности клинической интерпретации результатов [124, 191, 249].

Соответственно, ограничения аналитических подходов при оценке метаболизма ЖК связаны, прежде всего, с тремя группами факторов: во-первых, выбор матрицы и липидной фракции определяет временное окно показателя; сравнение динамики «до/после вмешательства» допустимо только при неизменных условиях забора и подготовки образцов и при фиксированной матрице [70]; во-вторых, преаналитические ошибки (условия хранения, время до обработки, окисление ПНЖК, количество циклов замораживания-размораживания) приводят

к систематическим искажениям долевого состава и расчетных индексов и должны контролироваться протоколом исследования [10]; в-третьих, методические особенности пробоподготовки и измерения (условия дериватизации, выбор колонки и режима разделения, критерии идентификации компонентов, учёт или неучёт изомеров) определяют точность результатов и возможность сопоставления между сериями и исследованиями. Обобщающие методические обзоры подчёркивают, что для ВЭЖХ-МС/МС анализов ЖК дериватизация является ключевым элементом методики и одновременно потенциальным источником систематических ошибок при несоблюдении стандартизированных условий [178].

При использовании профиля ЖК и производных индексов как показателей фармакологического эффекта требуется контроль воспроизводимости между аналитическими сериями и стабильности аналитической системы, включая регулярное применение контрольных образцов, фиксированные условия калибровки и документирование изменений расходных материалов и параметров метода. Значимость этих требований подчёркивается в руководствах и обзорах по липидомике как области, особенно чувствительной к вариабельности пробоподготовки и аналитической системы [305].

Также важной методической задачей является разработка и валидация математических моделей пересчёта жирнокислотных показателей и производных индексов между фракциями крови (плазма/сыворотка и их липидные фракции, эритроциты/мембраны эритроцитов, цельная кровь). Это обусловлено тем, что разные матрицы отражают различные липидные пулы и временные интервалы, а клинически значимый омега-3 индекс (ЭПК+ДГК в мембранах эритроцитов) часто требуется интерпретировать в исследованиях, где доступна только плазма (биобанки, ретроспективные когорты, ограничение объёма материала). Корректно построенные и проверенные модели пересчёта позволяют переводить плазменные значения омега-3-показателей в эквивалент эритроцитарного индекса и тем самым сохранять сопоставимость результатов и клиническую интерпретацию. Применимость такого подхода подтверждена систематическим анализом конверсионных соотношений между плазмой и эритроцитами с метарегрессией и валидацией на индивидуальных

данных, а также регрессионными моделями, специально разработанными для трансляции плазменного омега-3-показателя в эритроцитарный [127, 267].

Аналогичный подход особенно актуален для образцов сухих пятен крови (DBS). Для DBS показано, что величины ЭПК+ДГК могут быть преобразованы в эквивалент эритроцитарного омега-3 индекса с использованием регрессионных уравнений, полученных при прямом сопоставлении DBS и эритроцитарных измерений; это расширяет возможности применения омега-3 индекса в условиях удалённого отбора и масштабных популяционных исследований [119, 121].

Ограничением данного направления является необходимость обязательной валидации моделей пересчёта для конкретной исследуемой популяции, поскольку соотношения между фракциями зависят от структуры питания и экспозиции омега-3 (в т.ч. приёма добавок), а также от генетических факторов, влияющих на метаболизм ПНЖК (в частности, полиморфизмов генов FADS), что может приводить к систематическим ошибкам при переносе уравнений без адаптации [49, 127].

1.7. Научные предпосылки к разработке новых биомаркеров на основе профиля жирных кислот

Несмотря на прогресс в диагностике и лечении атеросклероза, у части пациентов с низким уровнем омега-3 ПНЖК в крови сохраняется ОВР и отмечается прогрессирование атеросклеротического поражения даже при эффективной терапии статинами и достижении целевых значений ХС ЛПНП [39, 52, 298]. Это наблюдение вызвало интерес к разработке и применению биомаркеров, отражающих не только содержание отдельных ПНЖК, но и состояние ключевых звеньев их метаболического пути [215]. В связи с этим, наряду с определением абсолютных концентраций ПНЖК в клинической практике используются расчетные показатели, которые включают статус омега-3 (ЭПК+ДГК), соотношение АК/ЭПК и

соотношение омега-6 к омега-3, применяемые для дополнительной характеристики липидного обмена и динамического наблюдения [81, 87].

В качестве кандидатов новых маркеров рассматриваются отдельные метаболиты омега-6 ПНЖК. АДК, образующаяся путём удлинения АК на два атома углерода под действием ферментов-элонгаз, привлекает внимание благодаря своим противовоспалительным свойствам [287]. Изменения отношения АК к АДК могут смещать баланс продукции медиаторов воспаления, а добавление АДК демонстрировало благоприятные эффекты в экспериментальных моделях воспаления [64]. Однако значимость этого отношения при атеросклерозе остаётся недостаточно изученной и требует подтверждения в исследованиях.

Перспективным направлением является интеграция нескольких ЖК в виде индексов активности десатураз и элонгаз. Индексы, основанные на отношениях «продукт/предшественник», рассматриваются как косвенные показатели направленности процессов десатурации и элонгации и потенциально пригодны для мониторинга метаболического ответа на вмешательства. Для пациентов с ССЗ описаны характерные изменения жирнокислотного профиля и соответствующих расчетных индексов, отражающие перестройку метаболизма ПНЖК при атеросклерозе [148, 150]. Вместе с тем единый биомаркер, интегрирующий несколько ферментативных этапов метаболизма ПНЖК в один диагностический показатель с подтверждённой клинической применимостью, в настоящее время отсутствует [81].

Показано, что при каротидном атеросклерозе выявляются изменения профиля ЖК в плазме и в составе атеросклеротических бляшек, включая повышение доли МНЖК и снижение доли омега-3 ПНЖК, что согласуется с возможными изменениями активности десатураз и элонгаз [91]. Эти метаболические сдвиги ассоциировались с признаками нестабильности бляшек и снижением уровней предшественников СПМ [91].

Полученные данные обосновывают необходимость разработки более комплексных индексов, способных эффективнее выявлять нарушения метаболизма

ЖК при атеросклерозе. Перенос таких индексов в клиническую практику требует стандартизации биологической матрицы, валидации моделей пересчёта между фракциями крови (включая DBS), а также подтверждения применимости расчетных моделей и пороговых значений в конкретной популяции с учётом особенностей питания и генетических факторов, влияющих на метаболизм ПНЖК [127].

1.8. Заключение по обзору литературы

Анализ современной литературы свидетельствует о том, что центральным звеном патогенеза атеросклероза является системное персистирующее низкоинтенсивное воспаление. Воспалительный фон поддерживается на всех стадиях атерогенеза, от формирования жировых полосок до дестабилизации бляшки, и сохраняется даже при достижении целевых уровней ХС ЛПНП на фоне терапии статинами, что обосновывает необходимость оценки воспалительно-метаболических механизмов заболевания наряду с традиционными липидными показателями [36, 107].

Среди ключевых модуляторов данного воспалительного фона особое место занимают омега-3 ПНЖК, прежде всего, ЭПК и ДГК. Их противовоспалительное действие реализуется через ингибирование арахидонат-зависимых эйкозаноидных каскадов, подавление NF-κB-опосредованной транскрипции провоспалительных цитокинов, активацию PPAR-α и образование специализированных проразрешающих медиаторов, включая резолвины, протектины и марезины, которые активно завершают воспалительный ответ [240, 263]. Показано, что низкий плазменный омега-3 статус является независимым предиктором прогрессирования коронарных бляшек даже при ХС ЛПНП менее 80 мг/дл на фоне терапии статинами, а достижение уровня не менее 4 % ассоциируется с предотвращением прогрессирования всех подтипов бляшек [39].

Для количественной оценки омега-3 статуса наиболее клинически валидированным показателем остаётся омега-3 индекс, определяемый как доля ЭПК+ДГК в мембранах эритроцитов, для которого предложены референсные диапазоны ССР: менее 4 % соответствуют высокому риску, от 4 до 8 % – промежуточному, более 8 % – низкому [117, 120, 122]. В клинической практике, однако, нередко доступна только плазма. Принципиальная осуществимость пересчёта плазменного показателя ЭПК+ДГК в эквивалент эритроцитарного омега-3 индекса подкреплена зарубежными данными [127, 267], однако валидация подобных моделей для российской популяции с характерными особенностями питания и полиморфизмами генов FADS, влияющих на метаболизм ПНЖК, в литературе не представлена.

Наряду с этим, существующие диагностические индексы, включая соотношения АК/ЭПК, омега-6/омега-3, а также индексы десатурации и элонгации, отражают лишь отдельные ферментативные этапы метаболизма ЖК и не обеспечивают интегральной оценки, специфичной для атеросклеротического процесса [81].

Оценка метаболизма ЖК в условиях атеросклероза и при применении гиполипидемической терапии предъявляет к аналитической методике ряд специфических требований, выходящих за рамки определения собственно омега-3 индекса [121, 268]. К таким требованиям относятся:

1) количественный охват всех классов ЖК, вовлечённых в ключевые ферментативные пути – НЖК как субстраты SCD1 и ELOVL6, МНЖК омега-7 и омега-9 как продукты SCD1, омега-6 и омега-3 ПНЖК как субстраты и продукты FADS1/2 и ELOVL2/5 [199, 220];

2) достоверное количественное определение минорных компонентов, концентрации которых в биологической матрице могут быть на 1–2 порядка ниже доминирующих ЖК;

3) разделение *цис*- и *транс*-изомеров, имеющих противоположное физиологическое и прогностическое значение [73, 195];

4) совместимость с малоинвазивным отбором биологической пробы, в том числе, с технологией DBS [121, 168];

5) соответствие требованиям валидации биоаналитических методов для применения в клинико-фармакологических исследованиях [94].

Суммируя вышесказанное, результаты исследований подтверждают необходимость разработки и внедрения биомаркеров, которые демонстрируют воспроизводимые изменения на фоне терапевтического вмешательства, имеют механистическую интерпретацию в контексте метаболизма ПНЖК и воспалительных процессов и обладают дополнительной клинической информативностью по сравнению с традиционными показателями липидного профиля [215].

Таким образом, анализ современной отечественной и зарубежной литературы формирует три взаимосвязанных направления настоящего исследования: 1) разработка аналитической методики профилирования ЖК в фракциях крови; 2) создание и валидация математической модели пересчёта плазменного омега-3 статуса в эквивалент эритроцитарного омега-3 индекса применительно к российской популяции пациентов; 3) разработка нового интегрального показателя изменений метаболизма ЖК при атеросклерозе, сохраняющегося при терапии статинами, на основе профиля ЖК для мониторинга гиполипидемической терапии.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Дизайн исследования

Исследование проводилось в соответствии с принципами Хельсинкской декларации и было одобрено Локальным этическим комитетом ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (протокол № 11-26 от 21.05.2026).

В сравнительный анализ были включены 102 человека. В группу «Атеросклероз» (n = 52) вошли пациенты с клинически и инструментально подтверждённым гемодинамически значимым стенозирующим атеросклерозом брахиоцефальных артерий, которым выполнялась плановая каротидная эндартерэктомия в кардиологической клинике Университетской клинической больницы № 1 Сеченовского Университета [17, 169]. Группу «Контроль» (n = 50) составили лица без клинических или визуализированных признаков атеросклероза [17, 169].

Дизайн исследования не предполагал терапевтических вмешательств или повторного забора образцов: оценка проводилась по исходным профилям ЖК в плазме у пациентов, получающих плановое лечение без изменения существующих схем фармакотерапии или приёма добавок омега-3. Дизайн исследования предусматривал формирование когорты с минимизацией фармакологически опосредованных смешивающих факторов при оценке профиля ЖК в плазме.

По этой причине в исследование включались пациенты с впервые выявленным или ранее установленным атеросклерозом, получавшие монокомпонентную липидоснижающую терапию (статины) или не получавшие её. Пациенты с комбинированной гиполипидемической терапией (статины в сочетании с эзетимибом, фибратами, ингибиторами PCSK9 либо препаратами омега-3 ЖК) в исследование не включались. Такой подход уменьшает вклад других

гиполипидемических препаратов и повышает интерпретируемость связей между терапией статинами и профилем ЖК.

Критерии включения в группу «Атеросклероз» были следующими: (1) возраст от 18 до 85 лет; (2) предоставление письменного информированного согласия; (3) подтверждённый диагноз гемодинамически значимого стенозирующего атеросклероза брахиоцефальных артерий, подтверждённый дуплексным ультразвуковым исследованием и/или многослойной компьютерной томографической ангиографией (МСКТ-ангиография), включая лиц с или без истории транзиторной ишемической атаки или инсульта, связанного с заболеванием сонных артерий; (4) наличие данных общего анализа крови и липидного профиля; (5) амбулаторное наблюдение или стационарное лечение в научно-исследовательском учреждении; (6) пациенты, перенёсшие каротидную эндартерэктомию [91].

Критерии исключения из группы «Атеросклероз»: (1) хроническая болезнь почек стадии 3b или выше (рСКФ < 45 мл/мин/1,73 м²); (2) тяжёлые несердечно-сосудистые соматические заболевания с ожидаемой продолжительностью жизни менее 6 месяцев; (3) хронические заболевания в фазе активного обострения; (4) масса тела менее 40 кг или более 125 кг; (5) беременность; (6) приём комбинированной гиполипидемической терапии (эзетимиб, фибраты, ингибиторы PCSK9) [91].

Критерии включения в контрольную группу (лица без признаков атеросклероза брахиоцефальной артерии): (1) возраст от 18 до 85 лет; (2) предоставление письменного информированного согласия; (3) отсутствие клинических симптомов, указывающих на атеросклероз; (4) отсутствие обнаруживаемого атеросклероза брахиоцефальной артерии на основании дуплексного ультразвукового исследования и/или МСКТ-ангиографии; (5) амбулаторное наблюдение или госпитализация в исследовательском учреждении [91].

Критерии исключения из контрольной группы: (1) наличие в анамнезе или клинические признаки системного атеросклероза или ССЗ; (2) аутоиммунные заболевания, злокачественные новообразования, хроническая обструктивная болезнь лёгких, хроническая болезнь почек (стадия ≥ 3) или цирроз печени; (3) острые инфекционные или воспалительные состояния на момент сбора образцов; (4)

обострение хронических заболеваний; (5) текущее лечение гиполипидемическими, противовоспалительными или иммунодепрессантами; (6) масса тела менее 40 кг или более 125 кг; (7) беременность. Сахарный диабет, хронический гастрит, перенесённые эпизоды тонзиллита, сезонный аллергический ринит и хорошо контролируемая артериальная гипертензия (1 стадия, без ССС или поражения органов-мишеней) вне фазы обострения не считались исключающими [91].

Исключение из исследования всех участников определялось отзывом информированного согласия на любом этапе участия.

Для построения и валидации математической модели пересчёта суммарного содержания ЭПК и ДГК в плазме крови в омега-3 индекс эритроцитов была использована выборка из 69 человек с парными образцами плазмы и эритроцитарной массы, в которую вошли лица группы «Контроль» [91]. Общая характеристика выборки для разработки математической модели представлена в таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Общая характеристика выборки для разработки математической модели прогнозирования омега-3 индекса в эритроцитах по данным плазмы [91]

Подгруппа	**Число (n)**	**Средний возраст**	**Средний омега-3 индекс, %**	**Медиана омега-3 индекса, %**	**Стандартное отклонение омега-3 индекса, %**
Мужчины	29	49	5,12	5,10	1,71
Женщины	40	43	5,17	5,14	1,34
Возраст < 36	18	28	5,22	5,00	1,82
36 ≤ возраст < 47	18	41	5,06	5,44	1,55
47 ≤ возраст < 58	16	52	5,25	5,39	0,96
58 ≤ возраст	17	63	5,06	4,97	1,59
Контрольная группа	50	42	5,30	5,32	1,57
Заболевания	19	56	4,73	4,55	1,21
Примечание: омега-3 индекс – доля ЭПК и ДГК от суммарного содержания ЖК в мембранах эритроцитов, %. Подгруппа «Заболевания» включала лиц с хроническими неинфекционными заболеваниями (сахарный диабет, артериальная гипертензия и др.) без диагностированного атеросклероза.					

2.2. Характеристика исследуемых групп

Пациенты группы «Атеросклероз» (n = 52) были ретроспективно стратифицированы на три подгруппы в зависимости от статуса лечения статинами на момент взятия образцов: 21 и 19 пациентов получали розувастатин и аторвастатин соответственно не менее 8 недель; 12 пациентам не назначалась терапия статинами. Иные гиполипидемические препараты (включая эзетимиб, фибраты или ингибиторы PCSK9) не назначались, что обеспечивало возможность оценки плейотропных эффектов терапии статинами в условиях, изолированных от вклада прочих липидоснижающих препаратов [92].

Средний возраст участников группы «Атеросклероз» и контрольной группы составил 67 и 46 лет соответственно. В группе с атеросклерозом отмечалась более высокая распространенность курения, артериальной гипертензии, сахарного диабета, ишемических сосудистых нарушений и заболеваний почек. В группе «Атеросклероз» 76,9 % (40 из 52) пациентов регулярно принимали статины; также фиксировалось применение ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента (АПФ), блокаторов кальциевых каналов, сартанов (блокаторы рецепторов ангиотензина II), β-блокаторов, антикоагулянтов и диуретиков.

Известно, что применение ингибиторов АПФ слабо влияет на показатели общего холестерина, ХС ЛПНП, ТГ и ХС ЛПВП, в то время как β-адреноблокаторы и тиазидные диуретики ухудшают липидный профиль [50, 257]. Учитывая тот факт, что в доступной литературе описано влияние ингибиторов АПФ на профиль ЖК крови только в эксперименте на животных [257] и отсутствуют клинические данные, прием ингибиторов ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (РААС) (34 из 52 пациентов, 65,4 %, группы «Атеросклероз») отдельно не учитывался. Оценку их возможного влияния на метаболизм ЖК следует проводить в дальнейших проспективных исследованиях. Характеристика исследуемых групп представлена в таблице 2.2.

Таблица 2.2 – Клиническая и демографическая характеристика исследуемых групп [91]

Параметры	**Группа 1 Контроль n = 50**	**Группа 2 Атеросклероз n = 52**	***p*-значение**
Всего (n = 102)	50 (49,0 %)	52 (51,0 %)	> 0,9999
Демографические характеристики			
Возраст, лет (M ± SD)	46 ± 11,6	67 ± 8,4	< 0,0001
Мужчины	28 (56,0 %)	40 (76,9 %)	0,0353
Женщины	22 (44,0 %)	12 (23,1 %)	0,0353
Поведенческие и антропометрические факторы риска			
Курение	6 (12,0 %)	25 (48,1 %)	< 0,0001
Ожирение (ИМТ ≥ 30 кг/м²)	9 (18,0 %)	14 (26,9 %)	0,3462
Сопутствующие заболевания			
Сахарный диабет	2 (4,0 %)	12 (23,1 %)	0,0078
Артериальная гипертензия	12 (24,0 %)	47 (90,4 %)	< 0,0001
Ишемическая болезнь сердца	0 (0,0 %)	18 (34,6 %)	< 0,0001
Ишемический инсульт	0 (0,0 %)	16 (30,8 %)	< 0,0001
СН СФВ	0 (0,0 %)	4 (7,7 %)	0,1179
Пароксизмальная фибрилляция предсердий	0 (0,0 %)	1 (1,9 %)	> 0,9999
Хроническая болезнь почек	3 (6,0 %)	27 (51,9 %)	< 0,0001
Прием лекарственных препаратов			
Статины	0 (0,0 %)	40 (76,9 %)	< 0,0001
Аторвастатин	0 (0,0 %)	19 (36,5 %)	< 0,0001
Розувастатин	0 (0,0 %)	21 (40,4 %)	< 0,0001
Ингибиторы АПФ	1 (2,0 %)	18 (34,6 %)	< 0,0001
Сартаны	1 (2,0 %)	16 (30,8 %)	< 0,0001
Ингибиторы РААС	2 (4,0 %)	34 (65,4 %)	< 0,0001
Дигидропиридиновые антагонисты кальция	0 (0,0 %)	17 (32,7 %)	< 0,0001
β-адреноблокаторы	0 (0,0 %)	30(57,7 %)	< 0,0001
Тиазидные диуретики	0 (0,0 %)	3 (5,8 %)	0,2429
Петлевые диуретики	0 (0,0 %)	2 (3,8 %)	0,4952
Индапамид (тиазидоподобный диуретик)	1 (2,0 %)	6 (11,5 %)	0,1125
Ингибиторы ксантиноксидазы	0 (0,0 %)	5 (9,6 %)	0,0566

Примечание: для категориальных переменных данные представлены как n (%); ИМТ – индекс массы тела; СН СФВ – сердечная недостаточность со сниженной фракцией выброса левого желудочка (менее 40 %); M – среднее; SD – стандартное отклонение. Данные по приёму препаратов представлены для отражения структуры сопутствующей фармакотерапии. Для категориальных переменных *p*-значения рассчитаны с использованием точного критерия Фишера; для возраста – с использованием *t*-критерия Уэлча.

Основные классы сопутствующей терапии и частота сахарного диабета статистически значимо не различались между подгруппами без терапии статинами, аторвастатина и розувастатина ($p = 0{,}07–0{,}81$; точный критерий Фишера–Фримена–Холтона). Это снижает вероятность того, что выявленные межгрупповые различия в профиле ЖК обусловлены выраженной несбалансированностью указанных

факторов. Из-за небольшого числа пациентов в подгруппах строго подтвердить их полную сопоставимость нельзя (Приложение А, таблица А.1).

С учетом наличия клинически значимого атеросклеротического поражения брахиоцефальных артерий пациенты были отнесены к категории очень высокого сердечно-сосудистого риска, для которой целевым уровнем ХС ЛПНП является < 1,4 ммоль/л [7]. Среди 40 пациентов, получавших терапию статинами, 20 пациентов получали терапию высокой интенсивности и 20 – терапию умеренной интенсивности. Целевого уровня ХС ЛПНП < 1,4 ммоль/л достигли 2 пациента из 20 (10,0 %) в подгруппе терапии высокой интенсивности и 1 пациент из 20 (5,0 %) в подгруппе терапии умеренной интенсивности. Медиана концентрации ХС ЛПНП составила соответственно 2,45 [2,18; 3,63] и 2,70 [2,25; 3,07] ммоль/л. Эти данные свидетельствуют о недостаточном достижении целевого уровня ХС ЛПНП в обеих подгруппах терапии статинами (Приложение А, таблица А.2).

Поскольку сопутствующий сахарный диабет может влиять на диагностическую информативность показателей жирнокислотного обмена [39], была выполнена проверка устойчивости результатов: ROC-анализ ключевых маркеров повторяли после исключения пациентов с сахарным диабетом из каждой группы сравнения. Несмотря на сокращение объёма подгрупп (группа «Атеросклероз» n = 40, контрольная группа n = 48), дискриминирующая способность маркеров сохраняла статистическую значимость во всех сравнениях, что подтверждает достаточность оставшейся выборки для данной задачи (Приложение А, таблица А.3).

В общей группе пациентов с атеросклерозом брахиоцефальных артерий уровень глюкозы крови натощак составил 5,31 [4,90; 5,89] ммоль/л. У пациентов без сахарного диабета данный показатель составил 5,26 [4,90; 5,52] ммоль/л, тогда как у пациентов с сахарным диабетом – 6,52 [5,50; 6,93] ммоль/л. Согласно алгоритмам специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом, для большинства взрослых пациентов адекватным является целевой уровень гликированного гемоглобина (HbA1c) менее 7,0 %. Данному уровню HbA1c соответствуют ориентировочные целевые значения глюкозы плазмы

натощак, перед приемами пищи, на ночь и ночью менее 7,0 ммоль/л [2]. Таким образом, наличие сахарного диабета в исследуемой группе не сопровождалось признаками явной декомпенсации углеводного обмена по данному лабораторному показателю.

2.3. Лабораторные методы исследования

В качестве основных показателей рассматривали профиль ЖК крови, отражающий метаболические сдвиги в путях НЖК, МНЖК, омега-6 и омега-3 ЖК, а также стандартные показатели липидного профиля.

2.3.1. Исследование профиля жирных кислот в крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией

Определение профиля ЖК выполняли с использованием ранее разработанного и валидированного метода жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) [93].

Реагенты и стандартные образцы. Все стандартные МЭЖК были приобретены у компании Larodan (Сольна, Швеция). Перечень аналитов включал 23 ЖК: метиловые эфиры НЖК (C12:0, C14:0, C16:0, C18:0, C20:0, C22:0, C24:0); метиловый эфир омега-7 МНЖК (C16:1n-7); метиловые эфиры омега-9 МНЖК (C18:1n-9, C20:1n-9, C24:1n-9); МЭЖК *транс*-изомеры (C16:1n-7 *транс*, C18:1n-9 *транс*, C18:2n-6 *транс*); эфиры омега-6 ПНЖК (C18:2n-6, C18:3n-6, C20:2n-6, C20:3n-6, C20:4n-6, C22:4n-6); метиловые эфиры омега-3 ПНЖК (ЭПК C20:5n-3, ДПК C22:5n-3, ДГК C22:6n-3). В качестве внутреннего стандарта использовали метиловый эфир гептадекановой кислоты (C17:0).

Растворителями служили метанол (Merck, LiChrosolv, hypergrade for LC-MS), ацетонитрил и изопропанол (для градиентной ВЭЖХ, AppliChem GmbH,

Германия). Деионизированную воду для ВЭЖХ получали с использованием установки Merck Milli-Q Advantage A10. Раствор трифторида бора в метаноле (BF_3–метанол, 14 %), 2,6-ди-трет-бутил-4-метилфенол (БГТ; ≥ 99,0 %), муравьиную кислоту (98 %) и формиат аммония (≥99,0 %) приобретали у Sigma-Aldrich (Сент-Луис, США).

Забор и подготовка биологических образцов. Образцы крови отбирали из локтевой вены в вакуумные пробирки с антикоагулянтом K_3EDTA после ночного голодания. Для получения плазмы кровь центрифугировали при 1000×g в течение 10 минут; затем 3/4 объёма плазмы переносили в новую пробирку и повторно центрифугировали при 2500×g в течение 15 минут для осаждения тромбоцитов. Надосадочную жидкость (плазму) аликвотировали в пробирки Eppendorf объёмом 2,0 мл. Эритроциты (для когорты из 69 человек) трижды промывали 0,9 % раствором хлорида натрия с удалением надосадочной жидкости. Все образцы фракций крови хранили при температуре −80 °C.

Подготовка проб к анализу. 40 мкл биологического образца (плазма крови, эритроцитарная масса) смешивали с 50 мкл раствора внутреннего стандарта (метилгептадеканоат, C17:0; 500 мкг/мл в метаноле) и 910 мкл метанола, содержащего БГТ (200 мкг/мл). Смесь перемешивали на шейкере в течение 30 мин при 2000 об/мин, затем центрифугировали при 1000×g в течение 5 мин. Далее 500 мкл надосадочной жидкости переносили в стеклянный флакон, добавляли 500 мкл 15 %-ного раствора BF_3 в метаноле, герметично закрывали и инкубировали при 100 °C в течение 90 мин для этерификации/переэтерификации ЖК. После охлаждения (+4 °C, 30 мин) и центрифугирования 500 мкл надосадочной жидкости смешивали с 500 мкл деионизированной воды и анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС [93].

Пробоподготовку калибровочных образцов и образцов КК выполняли следующим образом: 40 мкл биообразца (плазма крови, эритроцитарная масса) вносили во флакон объёмом 1,5 мл с винтовой крышкой. Затем добавляли 50 мкл раствора внутреннего стандарта в метаноле с концентрацией 200 мкг/мл, 100 мкл раствора стандартных веществ в метаноле требуемой концентрации и 810 мкл

метанола. Пробу перемешивали на шейкере в течение 30 мин при 2000 об/мин, после чего центрифугировали 5 мин при 1000×g. Далее 500 мкл надосадочной жидкости отбирали и переносили в стеклянный флакон 1,5 мл с винтовой крышкой, добавляли 500 мкл деионизированной воды и полученные образцы анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС [93].

Хроматографическое разделение и детектирование. Хроматографическое разделение выполняли на системе LC-20AD Prominence (Shimadzu, Япония) с использованием колонки Kinetex C8 (100 Å, 2,6 мкм, 3 мм × 100 мм; Phenomenex, США) с предколонкой SecurityGuard™ ULTRA (C8, 2 мм × 3 мм; Phenomenex). Элюент А: деионизированная вода с 0,1 % муравьиной кислотой и 5 мМ формиата аммония; элюент В: смесь ацетонитрила и изопропанола (1:1) с 1 % воды, 0,1 % муравьиной кислотой и 5 мМ формиата аммония. Разделение проводили в градиентном режиме при скорости потока 500 мкл/мин и температуре колонки 40 °C; общее время анализа − 20 мин; объём ввода пробы − 2 мкл. Хроматографический градиент: 0–8,00 мин 70 % В; 8,1–11 мин 77 % Б; 11,1–17,00 мин 93 % Б; 17.10–20.00 мин 70 % Б [93].

Детектирование выполняли на масс-спектрометре Sciex 4500 QTRAP (Sciex, Канада) с ЭРИ в режиме положительных ионов. Данные регистрировали в режиме мониторинга множественных реакций (MRM) с использованием аммонийных аддуктов $[M+NH_4]^+$, что обеспечивало повышенную чувствительность по сравнению с протонированными ионами $[M+H]^+$. После хроматографической колонки применяли делитель потока с подачей в источник ионизации не более 170 мкл/мин. Параметры источника ионизации: температура − комнатная (25 °C); напряжение ионного распыления − 5500 В; газ-завеса (CUR) − 35; газ 1 (GS1) − 50; газ 2 (GS2) − 50. Обработку данных выполняли с использованием ПО Analyst 1.6.3 и MultiQuant 3.0 (Sciex, Канада). Переходы MRM приведены в Приложении Б, таблице Б.1. [93].

Хроматографические условия обеспечивали удовлетворительное разделение *цис*- и *транс*-изомеров МЭЖК C16:1n-7, C18:1n-9 и C18:2n-6, что является необходимым условием для корректного профилирования ЖК.

Валидация метода проводилась в соответствии с рекомендациями EMA (Европейское агентство по лекарственным средствам, Guideline on bioanalytical method validation, EMEA/CHMP/EWP/192217/2009) [94]. Оценивались следующие параметры: диапазон калибровки, правильность, прецизионность (внутри- и межсерийная), нижний предел количественного определения (НПКО), корректность при разведении, матричный эффект, степень извлечения, селективность, эффект переноса и стабильность. НПКО составил 250 нг/мл для C12:0, C16:0 и C18:0 и 62,5 нг/мл для остальных МЭЖК. Все калибровочные зависимости имели коэффициенты корреляции $r \geq 0{,}99$.

2.3.2. Определение стандартных показателей липидного профиля для верификации сопоставимости выборки с данными литературы

Помимо таргетного профилирования ЖК, у пациентов группы атеросклероза определяли стандартные биохимические показатели липидного профиля: холестерин липопротеинов очень низкой плотности (ХС ЛПОНП), ХС ЛПНП, холестерин липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП), общий холестерин (ОХС) и ТГ. Данные показатели определяли рутинными лабораторными методами в клинической лаборатории Университетской клинической больницы № 1 Сеченовского Университета в рамках стандартного обследования пациентов, госпитализированных для каротидной эндартерэктомии.

Включение стандартного липидного профиля в настоящее исследование преследовало две цели. Во-первых, верификация сопоставимости изучаемой выборки с ранее опубликованными данными: поскольку в литературе хорошо описана взаимосвязь между уровнями омега-3 ЖК и показателями липидного обмена, воспроизведение ожидаемых закономерностей (обратная корреляция суммы ЭПК и ДГК с ТГ, положительная корреляция с ХС ЛПВП, модификация этих связей на фоне терапии статинами) позволяет подтвердить адекватность выборки и корректность аналитических измерений. Во-вторых, контроль биологической правдоподобности: сопоставление изменений жирнокислотного профиля с

динамикой классических липидных маркеров обеспечивает дополнительный уровень валидации результатов и верифицирует, что наблюдаемые метаболические паттерны соответствуют известным патофизиологическим механизмам.

Обоснованность данного подхода определяется следующими клинико-биохимическими предпосылками. Согласно систематическим обзорам и мета-анализам, приём омега-3 ПНЖК (ЭПК и ДГК) дозозависимо снижает уровень ТГ и может незначительно повышать ХС ЛПВП [261]. Терапия статинами оказывает выраженное влияние на уровни ХС ЛПНП и ТГ и может маскировать дополнительные эффекты омега-3 ЖК, что является ожидаемой закономерностью, описанной в ряде исследований [261, 286]. Кроме того, показано, что у пациентов, не принимающих статины, наблюдается значимая положительная корреляция между уровнями омега-3 и ХС ЛПВП, а также обратная корреляция с ТГ, тогда как на фоне терапии статинами эти взаимосвязи ослабевают [292].

Таким образом, воспроизведение указанных закономерностей в нашей когорте (сравнение корреляций омега-3 статуса с липидными показателями в подгруппах «без терапии статинами» и «на фоне терапии статинами») служит независимым критерием адекватности и биологической валидности исследуемой выборки, подтверждая, что метаболические процессы у наших пациентов в целом соответствуют общепринятым представлениям и ранее опубликованным данным.

2.4. Принципы количественного определения аналитов и расчета производных показателей

Количественное определение ЖК выполняли на основе отношения площади пика аналита к площади пика внутреннего стандарта (метилгептадеканоат, C17:0). Калибровочную зависимость строили методом взвешенной ($1/x^2$) линейной регрессии наименьших квадратов. Для построения калибровочной кривой использовали не менее шести точек.

Процентное содержание каждой ЖК расчитывали как молярную долю (мол. %). Концентрацию каждой ЖК, измеренную методом ВЭЖХ-МС/МС (нг/мл),

переводили в молярное количество путём деления на её молекулярную массу. Для каждого образца суммировали молярные количества всех ЖК, количественно определённых в панели, и выражали каждую ЖК как её молярное количество, делённое на эту сумму, умноженное на 100. ЖК со значениями ниже нижнего предела количественного определения в суммарное значение не включали. Формула расчета молярной доли: $Xi = ((Ci / Mi) / \Sigma(Cj / Mj)) \times 100$, где Xi − молярная доля i-й ЖК, Ci − измеренная концентрация, Mi − молекулярная масса соответствующей ЖК, $\Sigma(Cj / Mj)$ − сумма молярных количеств всех количественно определённых ЖК в образце.

На основании полученных молярных долей рассчитывали следующие показатели и индексы:

− омега-3 статус = ЭПК + ДГК, выраженный в мол.% от общего количества количественно определённых ЖК плазмы;

− отношение омега-6/омега-3 = C18:2n-6 + C18:3n-6 + C20:2n-6 + C20:3n-6 + C20:4n-6 + C22:4n-6 / ЭПК + ДПК + ДГК;

− отношение АК/ЭПК;

− соотношение C18:0/C18:1n-9 (НЖК/МНЖК): отношение молярной доли стеариновой кислоты к молярной доле олеиновой кислоты, используемое как косвенный маркер активности SCD1;

− соотношение C20:4n-6/C22:4n-6: отношение АК к АДК, отражающее активность элонгаз ELOVL2/5.

Также определяли дополнительные отношения «предшественник/продукт» для анализа активности путей десатурации и элонгации.

Омега-3 индекс в эритроцитах определяли как суммарное содержание ЭПК и ДГК от суммарного содержания ЖК в мембранах эритроцитов (для когорты из 69 человек, у которых анализировались обе фракции). Для пациентов группы атеросклероза, у которых были доступны только образцы плазмы, омега-3 индекс эритроцитов оценивали с использованием разработанной математической модели пересчёта.

2.5. Методы статистической обработки и анализа данных

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения G*Power (версия 3.1), R (версия 4.4.2) и GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, Бостон, США), а также программного обеспечения MultiQuant 3.0 (Sciex, Канада) для обработки хроматографических данных. Разработка логит-модели, валидация и представление результатов выполнялись в соответствии с рекомендациями TRIPOD [79].

Описательная статистика. Категориальные переменные представляли в виде частот (%), непрерывные переменные − как среднее (M) ± стандартное отклонение (SD) для нормально распределённых показателей или как медиану (Me) с межквартильным диапазоном [Q1; Q3] для показателей с ненормальным распределением. Нормальность распределения оценивали с использованием критерия Шапиро–Уилка.

Межгрупповые сравнения. Сравнение контрольной группы (n = 50) с объединённой группой атеросклероза (n = 52) и сравнение четырёх групп (контроль; атеросклероз на фоне аторвастатина, n = 19; атеросклероз на фоне розувастатина, n = 21; атеросклероз без статинов, n = 12). Для сравнения четырёх групп использовали однофакторный ANOVA для показателей с нормальным распределением и однородными дисперсиями; при неоднородности дисперсий применяли ANOVA Уэлча. Для показателей с ненормальным распределением использовали критерий Краскела–Уоллиса. При статистически значимом результате омнибусного теста выполняли апостериорные попарные сравнения: после ANOVA − тест Тьюки (Tukey HSD), после критерия Краскела–Уоллиса − тест Данна; *p*-значения корректировали поправкой Холма (Холма–Бонферрони). Для двухгрупповых сравнений применяли *t*-критерий Уэлча для нормально распределённых показателей и критерий Манна–Уитни в остальных случаях. Для категориальных данных использовали критерий хи-квадрат Пирсона или, при необходимости, точный критерий Фишера.

Оценка размера эффекта. Размер эффекта межгрупповых различий оценивали с использованием дельты Клиффа (Δ Клиффа) с 95 % ДИ. Δ Клиффа была выбрана как непараметрическая ранговая мера эффекта, сохраняющая корректность при ненормальности распределений и неравных размерах групп.

Оценка объёма выборки. Априорный расчет статистической мощности для основного двухгруппового сравнения (две независимые группы) выполняли в программе G*Power (версия 3.1). Расчет проводили при двустороннем уровне значимости $\alpha = 0,05$, целевой мощности 0,90, равном соотношении размеров групп и ожидаемом большом размере эффекта *d* Коэна = 0,80. При указанных параметрах минимальная необходимая численность составила 34 участника в каждой группе. Фактический объём выборки (50 человек в контрольной группе и 52 пациента в объединённой группе атеросклероза) превысил этот порог.

Для четырёхгруппового сравнения (контроль; атеросклероз на фоне аторвастатина; атеросклероз на фоне розувастатина; атеросклероз без терапии статинами) выполняли отдельный априорный расчет для однофакторного дисперсионного анализа (omnibus ANOVA). В качестве ожидаемого размера эффекта использовали *f* Коэна = 0,40 (большой эффект для ANOVA). При $\alpha = 0,05$ и мощности 0,90 минимальный суммарный объём выборки при равномерном распределении составил 96 участников (по 24 человека на группу); результаты представлены в таблице 2.3.

Таблица 2.3 – Результаты априорного анализа требуемой статистической мощности для сравнения четырёх групп

Размер эффекта *f* Коэна	**Градация размера эффекта**	**Мощность 80 %, N (n на группу)**	**Мощность 90 %, N (n на группу)**	**Мощность 95 %, N (n на группу)**
0,25	Средний	180 (45)	232 (58)	280 (70)
0,34	MDE при фактическом *N* и заданной мощности данного дизайна	100 (25)	128 (32)	156 (39)
0,40	Большой, использован в работе	76 (19)	96 (24)	112 (28)

Примечание: однофакторный ANOVA (fixed effects, omnibus), $\alpha = 0,05$, равное распределение по группам; $\lambda = f^2 \cdot N$, $df1 = k-1$, $df2 = N-k$. N − суммарный объём выборки, в скобках указана численность на группу. Фактический объём выборки в исследовании (N = 102) соответствует мощности ≥ 90 % для большого эффекта (*f* = 0,40). MDE − Minimum Detectable Effect / Минимально детектируемый эффект.

Априорный расчет мощности выполнен в параметрической рамке как планировочное приближение. Для показателей с непараметрическим анализом данный расчет остаётся консервативным с учётом высокой асимптотической относительной эффективности ранговых критериев.

Данный расчет рассматривали как планировочное параметрическое приближение для оценки мощности общего межгруппового теста (omnibus ANOVA). Поскольку фактическое распределение участников по четырём группам было неравномерным, а численность подгруппы пациентов без терапии статинами была ограниченной, мощность отдельных попарных сравнений (особенно с её участием) могла уступать мощности общего ANOVA. Для показателей, анализируемых непараметрическими методами, результаты расчета ANOVA использовали в качестве ориентира, а интерпретацию данных дополняли расчетом размера эффекта и его 95 % ДИ.

ROC-анализ. ROC-анализ и выбор порогового значения проводили с использованием пакета cutpointr для среды статистического программирования R. Оптимальное пороговое значение определяли путём максимизации индекса Юдена (*J)*; при наличии нескольких пороговых значений с одинаковым максимумом использовали середину плато. Значения AUC приводили со стандартными ошибками и 95 % ДИ, рассчитанными методом ДеЛонга. Проверка статистической значимости отличия AUC от уровня случайного угадывания (AUC = 0,5) осуществлялась с помощью критерия Вальда. ДИ для чувствительности и специфичности рассчитывали по методу Уилсона–Брауна.

Валидация моделей. Валидацию диагностической дискриминирующей способности маркеров и индексов проводили с применением стратифицированной 10-кратной кросс-валидации в сочетании с 1000 бутстреп-итерациями. Внутреннюю валидацию модели логистической регрессии (логит-модели) выполняли с получением скорректированных с учётом оптимизма оценок AUC, оценки Бриера и калибровочного наклона. Для регуляризованного отбора

переменных использовали метод LASSO. Достаточность объёма выборки для многомерного моделирования оценивали по критериям Райли.

Регрессионный анализ и пересчёт омега-3 индекса. Для разработки модели пересчёта показателей суммарного содержания ЭПК и ДГК в плазме в омега-3 индекс эритроцитов применяли линейную регрессию и линейную регрессию после логит-преобразования данных logit (y) = ln (y/(100 % − y)) и logit (x) = ln (x/(100 % − x)). Нормальность остатков оценивали тестом Шапиро–Уилка и Q–Q-графиками. Согласие моделей с фактическими данными оценивали с использованием анализа Бланда–Альтмана.

Корреляционный анализ. Для оценки взаимосвязи между уровнями ЖК и липидными биомаркерами в каждой подгруппе статинов проводили корреляционный анализ с линейной регрессией для непрерывных данных.

Коррекция множественных сравнений. С учётом множественного тестирования выполняли коррекцию *p*-значений в пределах каждого семейства взаимосвязанных гипотез с использованием процедуры Бенджамини–Хохберга для контроля доли ложных открытий (FDR, $q = 0{,}05$). Статистически значимыми считали результаты при двустороннем уровне значимости $p < 0{,}05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Разработка оригинальной аналитической методики исследования жирных кислот

В данном разделе описаны разработка и валидация чувствительного и воспроизводимого метода ВЭЖХ-МС/МС для количественного анализа 23 ЖК в 40 мкл цельной крови и эритроцитарной массы в форме МЭЖК. Перечень кислот включает НЖК, омега-7 и омега-9 МНЖК, омега-6 и омега-3 ПНЖК, а также их *транс*-изомеры. НПКО составил 250 нг/мл для C12:0, C16:0 и C18:0 и 62,5 нг/мл для остальных МЭЖК, включая ЭПК, ДГК и *транс*-изомеры МЭЖК C16:1n-7, C18:1n-9 и C18:2n-6.

Оптимизирована пробоподготовка для этерификации/метилирования ЖК с использованием раствора трифторида бора в метаноле (BF_3-метанол). Хроматографическое разделение выполняли на колонке C8 в градиентном режиме с применением смеси ацетонитрила, изопропанола и воды с добавлением 0,1 % муравьиной кислоты и 5 мМ формиата аммония. В результате решена задача разделения *цис*- и *транс*-изомеров МЭЖК C16:1n-7, C18:1n-9 и C18:2n-6.

Впервые оптимизировано детектирование МЭЖК методом масс-спектрометрии с электрораспылительной ионизацией в виде аммонийных аддуктов, что повысило чувствительность метода по сравнению с использованием протонированных ионов.

3.1.1. Выбор аналитического подхода и перечень фармакологически значимых аналитов

ЖК чаще всего анализируют в виде МЭЖК – продуктов реакции этерификации/переэтерификации (трансэтерификации), обладающих большей летучестью, поскольку для анализа ЖК в биологических образцах широко

применяется метод ГХ. Дериватизация ЖК улучшает хроматографическое разделение, повышает чувствительность и специфичность метода ГХ [38, 90, 109, 151, 224, 243]. Применение ВЭЖХ-МС/МС для анализа ЖК ограничено низкой эффективностью их ионизации в источнике электрораспыления вследствие низкой полярности этих соединений [282, 299]. Прямое определение ЖК методом ВЭЖХ-МС/МС возможно, как правило, лишь для наиболее высококонцентрированных ЖК фосфолипидов крови, таких как ДГК, ЭПК, АК и линолевая (C18:2n-6) кислоты [124, 249, 303]. Однако дериватизация ЖК с получением МЭЖК повышает чувствительность метода ВЭЖХ-МС/МС до 500 раз, что приводит к увеличению числа детектируемых ЖК [191]. Среди известных подходов к дериватизации ЖК наиболее универсальным является этерификация/метилирование, поскольку данный подход является стандартом для анализа методом ГХ с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС) и обеспечивает доступность стандартных образцов [243]. В связи с этим было принято решение разработать метод анализа ЖК в форме МЭЖК.

На основании данных, представленных в научных публикациях, перечень целевых аналитов для определения омега-3 индекса включает МЭЖК, метиловые эфиры омега-9-, омега-6- и омега-3 ННЖК, а также *транс*-изомеры метиловых эфиров ЖК [34, 41, 121, 133, 145].

Поскольку ЭРИ характеризуется сравнительно низкой воспроизводимостью, для получения корректных количественных данных необходимо нормировать измеряемые сигналы. Как правило, применение внутреннего стандарта (ВС), меченного стабильными изотопами, позволяет существенно повысить точность количественного определения. Среди изотопно-меченных внутренних стандартов чаще используют дейтерированные соединения по сравнению с 13C- и 15N-меченными аналогами вследствие большей доступности и более низкой стоимости. Однако при анализе ЖК выбор именно дейтерированного аналога каждого целевого соединения не является обязательным условием для создания воспроизводимого метода [274]. Использование дейтерированных внутренних стандартов для каждого целевого соединения реализуется, как правило, лишь при анализе ограниченного числа аналитов [124, 249]. В представленном исследовании

проведен одновременный анализ 23 ЖК, которые различаются по количеству атомов углерода и наличию двойных связей, а также их количеству (до 5). В результате аналиты отличаются по физико-химическим свойствам, что важно в контексте хроматографического разделения. Тем не менее, в ранее опубликованных исследованиях задача профилирования ЖК методом ВЭЖХ-МС/МС успешно решалась с использованием только одного внутреннего стандарта [191], и даже с применением соединения иной химической природы [303].

Нечётноцепочечные ЖК (C13:0, C15:0, C17:0, C17:1, C21:0) традиционно используют в качестве внутреннего стандарта при анализе ЖК методом ГХ-МС [34, 41, 140, 209, 243, 290]; в частности, ЖК C17 применяли в качестве внутреннего стандарта и в методе ВЭЖХ-МС/МС [218]. Нормальное содержание C17:0 в цельной крови человека составляет от 0 до 1 % (в редких случаях) от суммарного содержания ЖК и не влияет на значение омега-3 индекса [140, 268]. Концентрацию внутреннего стандарта в рабочем растворе, используемом при пробоподготовке, рассчитывали таким образом, чтобы минимизировать возможные интерференции в случае присутствия эндогенного C17:0 в образцах.

3.1.2. Оптимизация условий высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией и процедуры подготовки проб

Оптимизация масс-спектрометрического детектирования. Оптимизацию масс-спектрометрического детектирования проводили путём прямого ввода (direct infusion) с использованием шприца стандартных растворов МЭЖК с концентрацией 100 нг/мл непосредственно в источник ионизации детектора. Стандарты готовили в смеси метанол–вода 1:1 (об./об.) с добавлением 5 мМ формиата аммония. Скорость подачи пробы при вводе составляла 7 мкл/мин [93].

Установлено, что при указанных условиях ЭРИ в режиме положительных ионов ионы МЭЖК $[M+H]^+$ и $[M+NH_4]^+$ образуются с сопоставимой

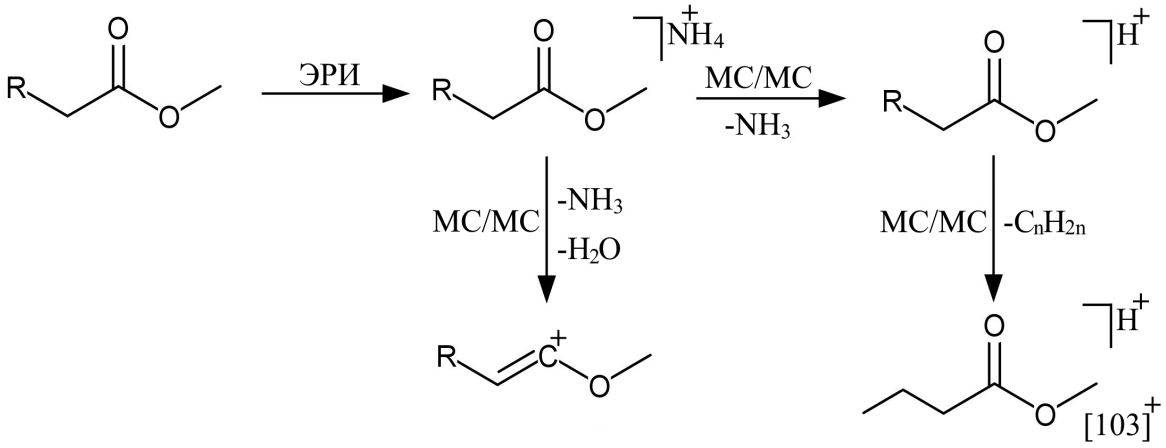
интенсивностью, в связи с чем параметры МС-детектирования оптимизировали для обоих типов аддуктов. Изучали характер фрагментации ионов МЭЖК при коллизионно-индуцированной диссоциации (газ соударений – азот) [93].

Характер фрагментации протонированных форм метиловых эфиров ННЖК соответствовал данным, ранее опубликованным в литературе [191, 283]. Наиболее интенсивные сигналы ионов-продуктов соответствовали ионам $[M+H–32]^+$ и $[M+H–50]^+$. Ион $[M+H–32]^+$ образуется в результате нейтральной потери метанола, тогда как образование иона $[M+H–50]^+$ обусловлено нейтральной потерей метанола и воды. В качестве количественного MRM-перехода был выбран ион-продукт $[M+H–32]^+$, а ион-продукт $[M+H–50]^+$ использовали для подтверждения [93].

Одним из наиболее интенсивных ионов-продуктов при фрагментации метиловых эфиров НЖК являлся ион $[103]^+$. Ионы $[M+H–18]^+$ (потеря воды) и $[M+H–32]^+$ (потеря метанола), описанные в литературе, в полученных спектрах практически не наблюдались [75]. На основании полученных данных ион $[103]^+$ был выбран для количественного определения метиловых эфиров НЖК в режиме MRM с использованием прекурсорных ионов $[M+H]^+$.

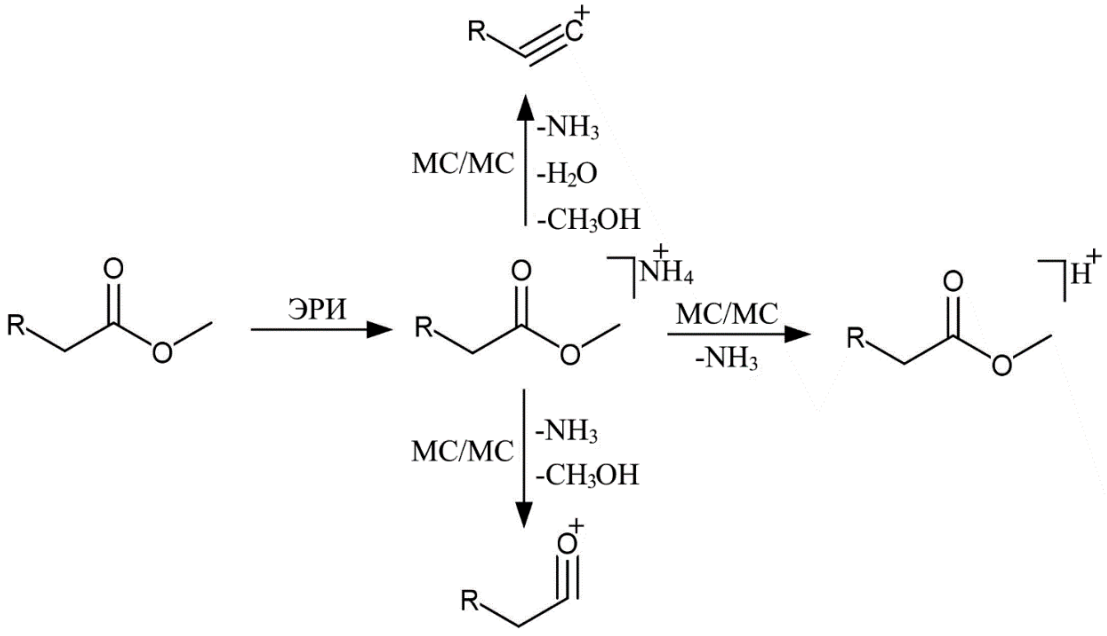
Фрагментация аммонийных аддуктов МЭЖК начинается с потери аммиака с образованием иона-продукта $[M+H–17]^+$ ($[M+H–NH_3]^+$). Для метиловых эфиров НЖК последующая нейтральная потеря воды приводит к образованию ионов-продуктов $[M+H–35]^+$ ($[M+H–NH_3–H_2O]^+$), тогда как для метиловых эфиров ННЖК характерно образование ионов-продуктов $[M+H–49]^+$ ($[M+H–NH_3–CH_3OH]^+$) и $[M+H–67]^+$ ($[M+H–NH_3–CH_3OH–H_2O]^+$). Во всех случаях наиболее интенсивным являлся ион-продукт $[M+H–17]^+$, поэтому его использовали в качестве количественного перехода в режиме МС/МС (MRM) при использовании прекурсорных ионов $[M+NH_4]^+$ [93].

Предполагаемая схема фрагментации метиловых эфиров НЖК и ННЖК представлена на рисунках 3.1 и 3.2.



Примечание: R – алкильный радикал жирнокислотной цепи

Рисунок 3.1 – Гипотетическая схема фрагментации метиловых эфиров НЖК при образовании аммонийных аддуктов $[M+NH_4]^+$ [93]



Примечание: R – алкильный радикал жирнокислотной цепи

Рисунок 3.2 – Гипотетическая схема фрагментации метиловых эфиров ННЖК при образовании аммонийных аддуктов $[M+NH_4]^+$ [93]

В ходе разработки метода было установлено, что интенсивность ионов МЭЖК снижается с повышением температуры источника ионизации независимо от типа аддукта. Далее приведены средние значения изменения сигнала в диапазоне

100–500 °C с шагом 100 °C на примере уровня верхнего предела количественного определения (ВПКО) для групп МЭЖК (таблица 3.1).

Таблица 3.1 – Изменение интенсивности сигнала аддуктов МЭЖК с NH_4^+ и H^+ в зависимости от температуры источника ионизации [93]

Соединение	**Аддукт**	**Температура источника ионизации**				
		100 °C	**200 °C**	**300 °C**	**400 °C**	**500 °C**
МЭЖК (НЖК) (n=7)	$[M+ NH_4]^+$	8,7 %	1,6 %	0,8 %	0,2 %	0,0 %*
	$[M+H]^+$	8,5 %	1,5 %	0,6 %	0,0 %*	0,0 %*
МЭЖК омега-9 (n=6)	$[M+ NH_4]^+$	12,2 %	2,1 %	1,1 %	0,6 %	0,2 %
	$[M+H]^+$	12,7 %	2,9 %	2,0 %	2,2 %	3,0 %
МЭЖК омега-6 (n=7)	$[M+ NH_4]^+$	23,8 %	5,3 %	3,3 %	2,4 %	1,8 %
	$[M+H]^+$	24,3 %	6,7 %	6,0 %	7,4 %	9,1 %
МЭЖК омега-3: ЭПК (C20:5n-3)	$[M+ NH_4]^+$	29,3 %	7,1 %	5,1 %	3,9 %	2,6 %
	$[M+H]^+$	33,1 %	9,4 %	10,6 %	13,4 %	17,6 %
МЭЖК омега-3: ДГК (C22:6n-3)	$[M+ NH_4]^+$	36,1 %	14,7 %	13,5 %	13,5 %	9,1 %
	$[M+H]^+$	37,7 %	18,5 %	19,4 %	23,4 %	26,6 %
Примечание: * не регистрировался пик аналита. Интенсивность сигнала целевого иона при температуре источника ионизации 25 °C (комнатная температура) принимали за 100 %.						

Интенсивность сигналов метиловых эфиров НЖК (включая внутренний стандарт МЭЖК C17:0) и МЭЖК омега-9 резко снижается уже при рабочей температуре источника ионизации 100 °C, тогда как для МЭЖК омега-6 и омега-3 выраженное снижение наблюдается начиная с 200 °C. Несмотря на то, что аммонийные аддукты (NH_4^+) в целом менее термостабильны, сигналы, получаемые для протонированных аддуктов (H^+) (особенно при нагреве источника), оказываются слишком низкими для полноценного количественного анализа исследуемых МЭЖК, поскольку исходно их интенсивность значительно ниже по сравнению с аддуктами NH_4^+ [93].

В связи с этим был выбран подход с делением потока, поскольку эффективная ионизация в используемом источнике без нагрева (при комнатной температуре 25 °C) возможна при расходе подвижной фазы до 150–200 мкл/мин.

Наблюдаемый характер образования аддуктов при ЭРИ согласуется с ранее опубликованными данными в исследованиях различных классов липидов. Липиды, содержащие атом азота, преимущественно образуют аддукты $[M+H]^+$, тогда как липиды, не содержащие атом азота в структуре, демонстрируют более высокую

интенсивность сигналов аддуктов $[M+NH_4]^+$ [288]. Соотношение образующихся аддуктов $[M+NH_4]^+/[M+H]^+$ определяется сродством (афинностью) соединения к протону и аммиаку.

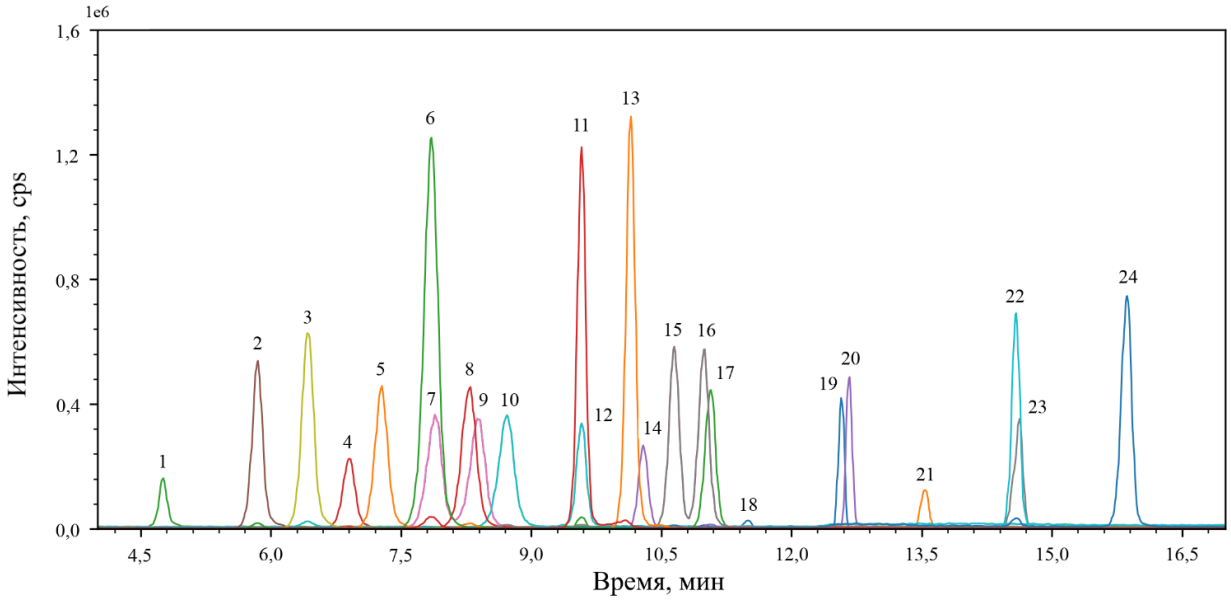
Аммиак (NH_3) обладает высокой протонной аффинностью – 854 кДж/моль, что в общем случае означает невозможность протонирования классов соединений с более низкой протонной аффинностью, таких как алканы, альдегиды, спирты и органические кислоты. Однако протонная аффинность МЭЖК сопоставима с протонной аффинностью NH_3 или превышает её, вследствие чего аддукт $[M+NH_4]^+$ преимущественно образуется непосредственно в источнике ионизации [243]. Это подтверждается валидационными испытаниями, продемонстрировавшими правильность и специфичность разработанного метода.

Оптимизация условий ВЭЖХ. Одновременное определение *цис*- и *транс*-метиловых эфиров ЖК C16:1n-7, C18:1n-9 и C18:2n-6 требовало подбора хроматографической колонки, обеспечивающей разделённые и симметричные пики. Были исследованы колонки с неподвижными фазами C8 и C18, поскольку они применяются для анализа ЖК и МЭЖК [124, 164, 191, 249, 269, 303]. Были протестированы три различные колонки C18: Kinetex C18 (100 Å, 2,6 мкм, 3x100 мм, Phenomenex, США), Kinetex XB-C18 (100 Å, 2,6 мкм, 3x100 мм, Phenomenex, США) и Symmetry C18 (100 Å 3,5 мкм 3x100 мм, Waters, США), а также три колонки C8: Kinetex C8 Column (100 Å, 2,6 мкм, 3x100 мм, Phenomenex, США), ZORBAX RR Eclipse Plus C8 (95 Å, 3,5 мкм, 3x100 мм, Agilent, США) и Kinetex C8 (100 Å, 1,7 мкм, 2,1x50 мм, Phenomenex, США).

При использовании фаз C18 элюирование МЭЖК происходило при содержании органического компонента B свыше 80–95 %, при этом удавалось достичь лишь частичного разделения *цис*- и *транс*-изомеров. При тестировании колонок с фазой C8 отмечалась тенденция к лучшему разрешению пиков изомеров, а наилучшие результаты были получены на колонке Kinetex C8 3×100 мм. Дополнительным ограничивающим фактором являлось время анализа, поэтому учитывали возможность его сокращения и уменьшения расхода элюента на один анализ. Хотя малая размерность частиц сорбента и малый внутренний объём

колонки Kinetex C8 (1,7 мкм, 2,1×50 мм) в целом позволяют снизить расход элюента при сопоставимом или меньшем времени анализа, разделение *цис*- и *транс*-изомеров на данной колонке представляется нереалистичным вследствие более низкой эффективности по сравнению с колонкой Kinetex C8 большего размера (2,6 мкм, 3 мм × 100 мм) [109, 280]. Выбор колонки с указанными параметрами является компромиссом, обеспечивающим воспроизводимое и эффективное разделение *цис*- и *транс*-изомеров МЭЖК.

Поскольку молекулярные ионы имеют специфические значения m/z для каждого соединения, даже совместно элюирующиеся МЭЖК могут быть количественно определены без наложения пиков, за исключением случаев изобарных *цис*- и *транс*-МЭЖК C16:1n-7, C18:1n-9 и C18:2n-6, которые должны быть хорошо разделены. В связи с этим время анализа составляет 20 мин, что сопоставимо с ранее опубликованными работами по одновременному определению сходного числа МЭЖК (рисунок 3.3) [191, 282].



Примечание: cps (counts per second) − интенсивность сигнала, отсчётов в секунду. Нумерация хроматографических пиков: 1 − C12:0; 2 − ЭПК (C20:5n-3); 3 − C18:3n-6; 4 − ДГК (C22:6n-3); 5 − C14:0; 6 − C20:4n-6; 7 − C16:1n-7; 8 − C22:5n-3; 9 − C16:1n-7 *транс*; 10 − C18:2n-6; 11 − C20:3n-6; 12 − C18:2n-6 *транс*; 13 − C22:4n-6; 14 − C16:0; 15 − C18:1n-9; 16 − C18:1n-9 *транс*; 17 − C20:2n-6; 18 − C17:0 (внутренний стандарт); 19 − C18:0; 20 − C20:1n-9; 21 − C20:0; 22 − C24:1n-9; 23 − C22:0; 24 − C24:0

Рисунок 3.3 – Хроматографическое разделение целевых МЭЖК на уровне верхнего предела количественного определения (ВПКО; 8000 нг/мл) [93]

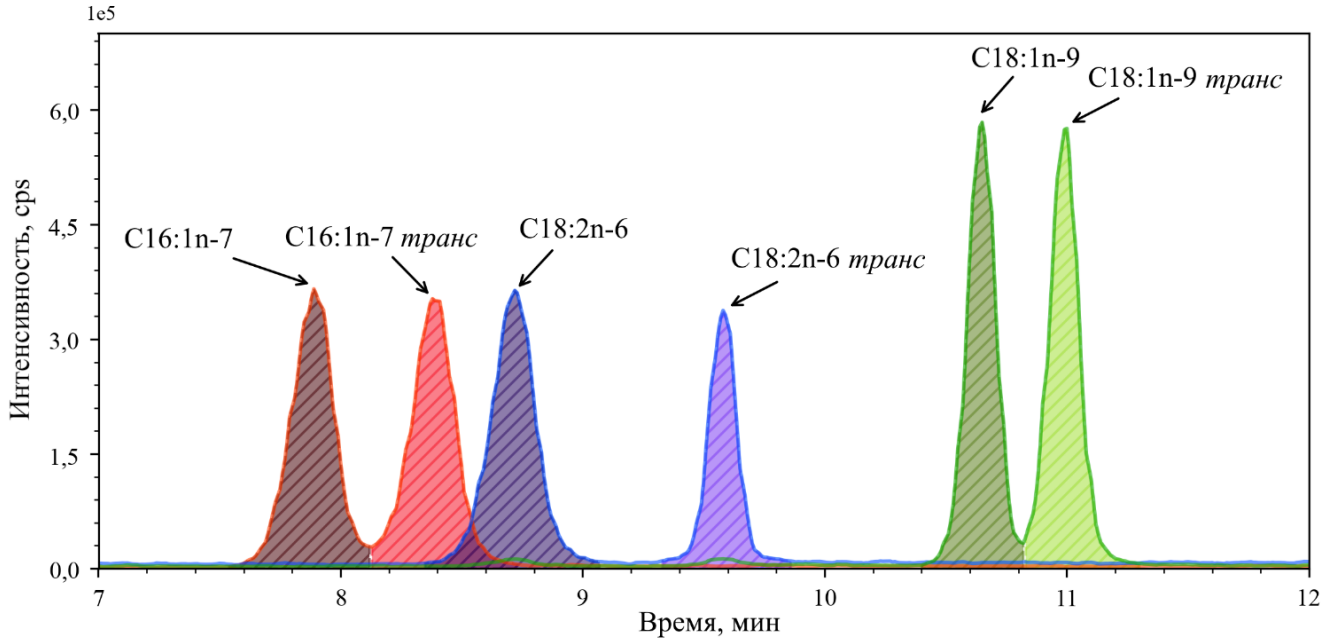
При анализе ЖК и МЭЖК на колонках с неподвижными фазами С8 и С18 с последующим МС-детектированием в качестве органического компонента подвижной фазы обычно используют ацетонитрил, изопропанол и реже метанол. Типичными добавками к подвижной фазе являются муравьиная кислота (0,05–0,1 %), формиат аммония и ацетат аммония [124, 191, 256].

Использование в компоненте В подвижной фазы только изопропанола повышает интенсивность сигналов МЭЖК (как аддуктов H^+, так и NH_4^+), однако при этом наблюдается уширение пиков, а *цис*- и *транс*-изомеры разделяются лишь на уровне вершин пиков, что делает невозможным корректное определение площадей пиков веществ. Добавление ацетонитрила приводит к снижению сигнала на 10–30 %, но существенно улучшает разрешение. Поскольку ЖК в форме МЭЖК присутствуют в биологических образцах в значительных количествах, указанное снижение сигнала можно считать несущественным. Соотношение изопропанола и ацетонитрила 1:1 (об./об.) решает задачу разделения пиков *цис*- и *транс*-изомеров при сохранении приемлемой чувствительности метода [93].

Добавление формиата аммония в компонент А подвижной фазы создаёт условия для образования аддуктов NH_4^+, при этом существенных различий в интенсивности сигнала МЭЖК при использовании формиата аммония в концентрациях 5, 10 и 20 мМ не наблюдалось. Однако при увеличении концентрации формиата аммония возрастает время удерживания аналитов, что затрудняет хроматографическое разделение изомеров. В связи с этим была выбрана концентрация 5 мМ [93].

В указанных условиях для элюирования МЭЖК требовалось повысить исходную долю органического компонента подвижной фазы до значений выше 80–85 %; добавление 0,1 % муравьиной кислоты к 5 мМ формиату аммония пропорционально уменьшало времена удерживания всех МЭЖК без снижения эффективности разделения изомеров. В результате был сформирован ступенчатый градиент (т. е. несколько изократических ступеней) с более низким начальным содержанием органического компонента, что позволило более эффективно подбирать условия разделения изомеров: 70 % фазы В − разделение *цис*- и *транс*- С16:1n-7, 77

% фазы В – *цис*- и *транс*-С18:1n-9 и С18:2n-6. Содержание фазы В увеличивали до 93 % сразу после элюирования изомеров С18:1 для элюирования наиболее сильно удерживаемых МЭЖК и сокращения времени анализа (рисунок 3.4) [93].



Примечание: cps (counts per second) – интенсивность сигнала, отсчётов в секунду. На хроматограмме первым элюируется *цис*-изомер, затем – *транс*-изомер

Рисунок 3.4 – Хроматографическое разделение *цис*- и *транс*-МЭЖК С16:1n-7 (70 % фазы В), С18:1n-9 и С18:2n-6 (77 % фазы В) [93]

Оптимальное соотношение элюентов А и В на первой ступени подбирали эмпирически с шагом 1 % с учётом наблюдаемого влияния на разделение. Несмотря на столь точную настройку, робастность метода была подтверждена. По своим характеристикам насос Prominence LC20AD способен поддерживать точный расход, начиная с 0,0001 мл/мин, при RSD 0,06 %, поэтому желательно использовать ВЭЖХ-систему с сопоставимыми характеристиками.

Температуру колонки исследовали в диапазоне 35–45 °С. При снижении температуры улучшалось разделение изобарных МЭЖК (*цис*- и *транс*-изомеров), однако времена удерживания длинноцепочечных метиловых эфиров НЖК становились чрезмерно большими [282]. При температуре 45 °С разделение изобарных МЭЖК ухудшалось, поэтому в качестве компромисса была выбрана

температура 40 °С: *цис*- и *транс*-изомеры разделялись практически до базовой линии при сохранении приемлемой продолжительности анализа.

Оптимизация процедуры подготовки проб. Антиоксидантная активность БГТ позволяет защищать ПНЖК и их метиловые эфиры от деградации [168, 188]. По данным литературы, для приготовления стандартных растворов использовали метанол, содержащий 2 мг/мл БГТ [168]. После приготовления биологических образцов и стандартов конечная концентрация БГТ составляла 100 мкг/мл, что было достаточным для стабилизации подготовленных биологических образцов в течение 7 суток и стандартных растворов – в течение 112 суток.

Небольшой объём биологического образца был выбран с учётом перспективного применения разработанного метода для анализа DBS. Обычно при отборе методом DBS собирают около 25–40 мкл крови, поэтому для пробоподготовки был выбран объём 40 мкл [121].

Метилирование с использованием BF_3 в метаноле является одним из наиболее распространённых подходов к получению МЭЖК благодаря высокой этерифицирующей способности реагента [55, 71, 121, 168, 224]. Профилирование ЖК в мембранах эритроцитов требует максимально полного протекания реакции метилирования как для свободных ЖК, так и для связанных форм, входящих в состав различных классов липидов. BF_3 в метаноле (кислота Льюиса, сильный кислотный катализатор) при концентрации 12–14 % способен метилировать свободные ЖК в течение нескольких минут [187]. При увеличении времени реакции и нагревании до 100°С данный подход может быть использован для переэтерификации (трансэнтерификации) большинства классов липидов [71, 209, 235]. Реакция наиболее быстро протекает для моноглицеридов, диглицеридов, фосфатидилэтаноламинов, фосфатидилсеринов, фосфатидилхолинов, монофосфоинозитидов и моногалактозилдиглицеридов – до 10 мин; переэтерификация ТГ, эфиров стеролов, фосфатидилхолинов (холиновых плазмалогенов) и дигалактозилдиглицеридов занимает около 45 мин, а сфингомиелинов – до 90 мин [194].

Экспериментально установлено, что оптимальным является добавление 500 мкл раствора BF_3 в метаноле (15 %). При добавлении 250 мкл раствора BF_3 в метаноле (15 %) количество образовавшихся МЭЖК было на 30–40 % меньше, чем при добавлении 500 мкл. При добавлении 1000 мкл раствора BF_3 в метаноле (15 %) количество образовавшихся МЭЖК было лишь на 5–10 % выше по сравнению с добавлением 500 мкл [93].

В качестве альтернативы исследовали пробоподготовку с использованием ультразвуковой ванны, нагретой до 60 °C, в течение 90 мин, однако данный подход оказался менее эффективным. Доля МЭЖК, полученных при обработке в ультразвуковой ванне, относительно МЭЖК в образце, подготовленном по стандартной процедуре, составляла от 6,2 % (C24:1n-9) до 74,36 % (C16:1n-7).

Оптимальная продолжительность реакции метилирования составляет 90 мин. Для эксперимента использовали эритроцитарную массу добровольца, принимавшего пищевую добавку, содержащую омега-3 ПНЖК. Исследовали временные точки 15, 30, 45, 60, 90 и 120 мин, по 3 повтора на каждую точку. При времени реакции 45 мин количество образовавшихся МЭЖК составляло 65-93 % (среднее 77 %, RSD 8,9 %) от значения при 120 мин; при 60 мин – 72-94 % (среднее 84 %, RSD 6,0 %); при 90 мин – 91-99 % (среднее 95 %, RSD 2,4 %) [93]. Далее приведены концентрации МЭЖК (средние значения) и рассчитанные значения омега-3 индекса при различных временах реакции дериватизации (таблица 3.2).

Таблица 3.2 – Исследование кинетики реакции этерификации / переэтерификации ЖК [93]

МЭЖК/ Время	**Концентрация, нг/мл; M ± SD**					
	15 мин	**30 мин**	**45 мин**	**60 мин**	**90 мин**	**120 мин**
C14:0	119,1 ± 3,5	168,3 ± 1,9	200,4 ± 12,8	212,8 ± 5,4	248,6 ± 7,6	268,4 ± 10,5
C16:0	5070,2 ± 93,2	7352,7 ± 177,7	8104,4 ± 233,8	8968,2 ± 340,1	10792,0 ± 699,4	11485,1 ± 818,8
C18:0	2596,3 ± 164,4	3520,6 ± 287,2	3604,4 ± 226,2	4111,6 ± 168,3	4336,5 ± 52,7	4578,5 ± 54,7
C20:0	Н/О	Н/О	Н/О	89,4 ± 7,4	106,1 ± 11,7	111,1 ± 9,9
C22:0	Н/О	275,1 ± 29,4	527,0 ± 47,5	555,8 ± 54,7	578,7 ± 28,7	625,4 ± 18,2
C24:0	Н/О	554,5 ± 25,9	1071,7 ± 55,7	1061,7 ± 33,8	1237,5 ± 138,4	1284,0 ± 187,7
C16:1n-7	394,56 ± 12,8	549,87 ± 30,8	605,22 ± 32,5	664,25 ± 38,3	765,13 ± 40,2	812,66 ± 66,6
C18:1n-9	6144,2 ± 90,6	8915,5 ± 250,1	9312,7 ± 666,8	10621,0 ± 268,1	11859,8 ± 516,5	12358,3 ± 265,2
C18:1n-9 *транс*	184,1 ± 18,4	278,6 ± 56,4	287,7 ± 12,8	317,6 ± 35,0	413,5 ± 40,5	441,2 ± 17,3
C20:1n-9	Н/О	Н/О	92,8 ± 10,2	94,0 ± 9,5	98,1 ± 6,2	99,6 ± 3,6
C24:1n-9	Н/О	655,5 ± 41,4	1411,7 ± 164,4	1295,2 ± 153,9	1432,9 ± 130,2	1550,2 ± 63,8
C18:2n-6	3754,7 ± 104,2	5798,4 ± 70,8	5881,3 ± 403,4	6638,3 ± 152,1	7257,7 ± 123,4	7545,2 ± 173,4
C18:3n-6	103,1 ± 3,0	153,2 ± 9,8	169,2 ± 7,3	183,5 ± 7,8	212,2 ± 11,7	222,8 ± 8,7
C20:2n-6	73,8 ± 5,0	119,1 ± 2,1	122,8 ± 4,9	141,7 ± 9,4	158,5 ± 7,7	163,8 ± 6,6
C20:3n-6	452,1 ± 31,1	726,7 ± 33,7	767,7 ± 32,9	835,5 ± 85,3	880,4 ± 66,9	964,1 ± 25,3
C20:4n-6	2551,9 ± 65,3	4136,6 ± 175,6	4220,2 ± 204,6	4761,7 ± 119,7	5478,3 ± 141,4	5905,6 ± 275,3
C22:4n-6	272,3 ± 7,1	414,2 ± 25,3	430,2 ± 16,1	476,8 ± 23,3	608,1 ± 26,3	611,8 ± 25,5
C22:5n-3	410,0 ± 2,2	625,5 ± 54,5	663,0 ± 15,7	750,7 ± 56,2	847,4 ± 36,9	860,0 ± 19,2
ЭПК C20:5n-3	466,2 ± 16,0	755,4 ± 52,7	821,8 ± 49,6	887,2 ± 58,7	1007,8 ± 67,0	1067,5 ± 26,5
ДПК C22:6n-3	1184,5 ± 25,2	1994,00 ± 114,5	1998,6 ± 98,1	2281,6 ± 151,0	2688,6 ± 45,7	2756,7 ± 77,1
Омега-3 индекс	14,4 ± 0,3	13,5 ± 0,4	14,3 ± 0,4	14,2 ± 0,9	13,8 ± 0,2	14,1 ± 0,6
Примечание: Н/О – не обнаружено, концентрация вещества ниже НПКО. Данные представлены как M ± SD. M – среднее; SD – стандартное отклонение.						

Полученные данные показывают, что концентрации при времени реакции 90 и 120 мин статистически значимо не различаются, что позволяет сделать вывод о практически полном завершении реакции дериватизации к 90-й минуте. Коэффициент вариации концентраций МЭЖК в образцах (n = 3) при длительности реакции 90 мин находился в диапазоне 1,2–11,2 %, а при 120 мин – 1,2–14,62 %. При этом омега-3 индекс надёжно определялся уже с 15-й минуты реакции [41]. Среднее значение омега-3 индекса для всех временных точек составило 14,03 (RSD 2,5 %).

Несмотря на то, что концентрации МЭЖК C12:0, C16:1 транс и C18:2 транс в исследуемом образце были ниже НПКО, низкая вариабельность концентраций остальных аналитов при 90 мин по сравнению со 120 мин свидетельствует о том, что реакция протекает сходным образом для всех исследованных ЖК.

3.1.3. Обоснование применения аммонийных аддуктов метиловых эфиров жирных кислот при электрораспылительной ионизации

Сигналы аммонийных и протонированных форм МЭЖК сравнивали с использованием образцов на уровнях НПКО (n = 6) и ВПКО (n = 3). Используемые MRM переходы указаны в приложении Б, таблице Б.1. Правильность и прецизионность на уровне НПКО оценивали для аммонийных аддуктов NH_4^+ (n = 6), тогда как для протонированных аддуктов H^+ оценивали только отношение сигнал/шум на уровне НПКО; также были определены уровни предела обнаружения только для аммонийных аддуктов.

Если предел обнаружения рассчитывают для характеристики аналитического метода, а рабочий диапазон концентраций существенно превышает предел обнаружения, то допускается его оценка упрощённым способом [95]. Значения предела обнаружения рассчитывали для S/N = 3 с использованием максимальной площади пика аналита, наблюдавшейся в шести различных источниках холостых проб (таблица 3.3) [282].

Таблица 3.3 – Оценка S/N на уровне НПКО и сравнение сигналов аддуктов МЭЖК с NH_4^+ и H^+; уровень предела обнаружения для аммонийных аддуктов МЭЖК [93]

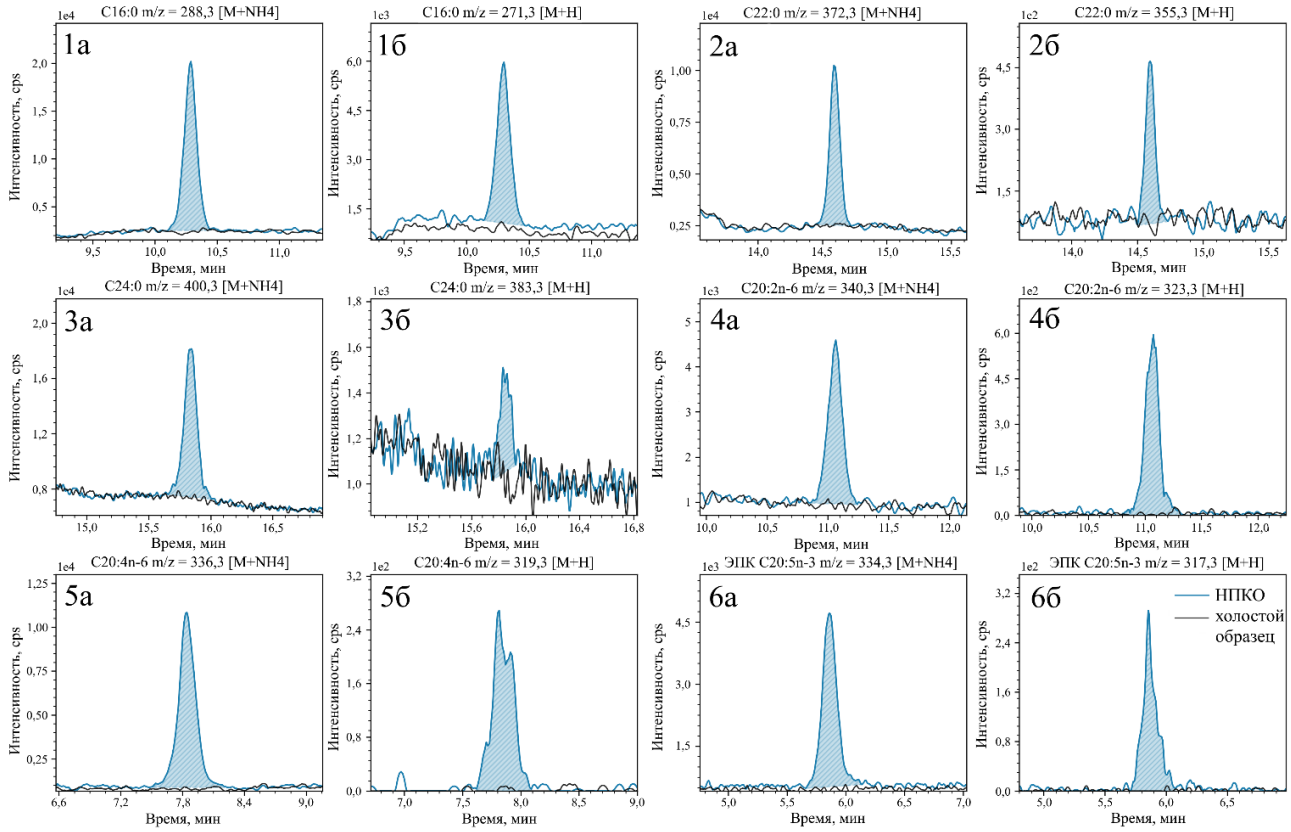
МЭЖК	НПКО, нг/мл	ПО, нг/мл	% Nom НПКО NH_4^+	% RSD НПКО NH_4^+	S/N NH_4^+ аддукт	S/N H^+ аддукт	Средний сигнал аддукта H^+ к NH_4^+
C12:0	250	24,2	100,8	2,1	31	42	19 %
C16:0		50,0	96,9	6,9	15	7	29 %
C18:0		30,0	98,9	4,1	25	9	10 %
C14:0	62,5	5,5	91,7	10	34	45	16 %
C20:0		6,5	93,8	10,4	29	27	18 %
C22:0		7,5	92	5,9	25	14	5 %
C24:0		4,2	93,3	6,8	45	3*	4 %
C16:1n-7		2,6	102,4	16,7	72	69	19 %
C18:1n-9		7,5	88,4	9	25	20	19 %
C20:1n-9		1,9	86,4	11,4	100	4*	18 %
C24:1n-9		1,8	96,5	5,7	102	140	9 %
C16:1n-7 *транс*		7,2	90,4	11,7	26	29	20 %
C18:1n-9 *транс*		13,4	93,7	7,2	14	23	19 %
C18:2n-6 *транс*		4,5	87	8,3	42	43	14 %
C18:2n-6		5,4	96,5	12,2	35	33	13 %
C18:3n-6		2,3	97,9	6	82	41	4 %
C20:2n-6		1,0	103,5	9,2	192	79	13 %
C20:3n-6		7,5	94,3	5	25	23	3 %
C20:4n-6		1,0	97,8	9,6	191	76	3 %
C22:4n-6		2,9	96,5	4,2	64	47	2 %
C22:5n-3		2,6	100,3	8,1	72	44	3 %
ЭПК (C20:5n-3)		1,4	98,2	5,1	132	91	5 %
ДГК (C22:6n-3)		4,9	93,6	11,6	38	34	12 %

Примечание: ПО – предел обнаружения; % Nom – найдено, % от номинала; % RSD – относительное стандартное отклонение, %. * S/N – ниже соответствующего критерия для НПКО (≥ 5).

Все аммонийные аддукты МЭЖК надёжно детектируются на указанных уровнях НПКО при отношении сигнал/шум (S/N) в диапазоне 15–191. Аммонийные аддукты МЭЖК демонстрируют существенно более высокую интенсивность сигнала по сравнению с соответствующими протонированными формами. Интенсивность сигнала аддуктов NH_4^+ в среднем превышала сигнал аддуктов H^+ в 3,5 раза для C16:0 и до 63,6 раза для МЭЖК C22:4n-6 [93].

Цис- и *транс*-изомеры метиловых эфиров ЖК C16:1n-7, C18:1n-9 и C18:2n-6 характеризуются сопоставимой интенсивностью сигналов аддуктов NH_4^+ и H^+, а также близкими значениями S/N на уровне НПКО. В целом значения S/N для аммонийных аддуктов МЭЖК либо выше, либо сопоставимы со значениями S/N

для протонированных аддуктов. Сравнение интенсивности сигналов аммонийных и протонированных аддуктов МЭЖК на уровне НПКО представлено на рисунке 3.5.



Примечание: cps (counts per second) – интенсивность сигнала, отсчётов в секунду

Рисунок 3.5 – Интенсивность сигналов аммонийных (а) и протонированных (б) аддуктов МЭЖК С16:0 (1), С22:0 (2), С24:0 (3), С20:2n-6 (4), С20:4n-6 (5) и ЭПК (С20:5n-3) (6) на уровне НПКО по сравнению с холостой пробой [93]

Количественное определение протонированных аддуктов МЭЖК С24:0 и С20:1n-9 требует повышения уровня НПКО, поскольку отношение S/N для них ниже 5 вследствие низкого отклика. Как правило, для образцов уровня НПКО требуется значение S/N, равное или превышающее 10 [273, 300]. При применении этого критерия протонированные аддукты МЭЖК С16:0 и С18:0 также не соответствуют требованиям к уровню НПКО. Вместе с тем достаточное отношение S/N само по себе не подтверждает пригодность выбранного уровня НПКО: возможность количественного определения дополнительно оценивают по правильности и прецизионности результатов при данной концентрации [273] .

3.1.4. Аналитические характеристики метода

3.1.4.1. Валидация метода

Валидационные испытания проводили в соответствии с рекомендациями руководящих документов EMA [94]. Оценивали следующие параметры: диапазон калибровки, правильность, прецизионность, НПКО, корректность при разведении, матричный эффект, извлечение (выход), селективность, эффект переноса (carry-over) и стабильность.

Все калибровочные зависимости соответствовали критериям точности и прецизионности во всём исследованном диапазоне концентраций, а коэффициенты корреляции (r) составляли ≥ 0,99 (таблица 3.4).

Таблица 3.4 – Диапазоны концентраций аналитов и уравнения регрессии [93]

МЭЖК	**Линейный диапазон, нг/мл**	**Уравнение регрессии**	**Коэффициент корреляции (r)**
C12:0	250–8000	y = 9,35297e-4 x + 0,00389	0,99973
C16:0		y= 0,00223 x + 0,12400	0,99569
C18:0		y = 0,00261 x + 0,26738	0,99033
C20:0	62,5–2000	y = 0,00150 x + 0,05456	0,99806
C22:0		y = 0,00539 x + 0,13272	0,99311
C24:0		y = 0,00842 x + 0,17667	0,99788
C16:1n-7		y = 0,00697 x + 0,04638	0,99868
C20:1n-9		y = 0,00409 x + 0,13919	0,99654
C24:1n-9		y = 0,00597 x + 0,07495	0,99794
C16:1n-7 *транс*		y = 0,00628 x + 0,06359	0,99874
C18:1n-9 *транс*		y = 0,00736 x + 0,11388	0,99828
C18:2n-6 *транс*		y = 0,00488 x + 0,06431	0,99793
C14:0	62,5–8000	y = 0,00468 x + 0,04222	0,99841
C18:1n-9		y = 0,00578 x + 0,21997	0,99729
C18:2n-6		y = 0,00669 x + 0,04331	0,99719
C18:3n-6		y = 0,01105 x + 0,11518	0,99806
C20:2n-6		y = 0,00560 x + 0,04606	0,99927
C20:3n-6		y = 0,01169 x + 0,16387	0,99856
C20:4n-6		y = 0,01981 x + 0,15997	0,99964
C22:4n-6		y = 0,01405 x + 0,13687	0,99897
C22:5n-3		y = 0,00754 x + 0,02841	0,99939
ЭПК C20:5n-3		y = 0,00768 x + 0,10392	0,99873
ДГК C22:6n-3		y = 0,00317 x + 0,03270	0,99908

Разработанный аналитический метод продемонстрировал приемлемые характеристики в ходе валидации. Точность между аналитическими циклами на четырёх уровнях КК находилась в диапазоне 91,1–109,6 %, прецизионность внутри одного аналитического цикла (RSD, %) – 0,5–14,9 %, а прецизионность между аналитическими циклами (RSD, %) – 2,6–12,7 %, что соответствует требованию ± 15,0 % (± 20,0 % для образцов уровня НПКО) [19]. Полученные данные свидетельствуют о том, что МЭЖК C17:0 в качестве внутреннего стандарта может быть использован для одновременного количественного определения выбранных 23 ЖК [93].

НПКО при отношении сигнал/шум более 5 для метиловых эфиров НЖК C12:0, C16:0 и C18:0 составил 250 нг/мл, тогда как для всех остальных аналитов – 62,5 нг/мл при коэффициенте вариации менее 20 % (2,1–16,7 %) и точности в диапазоне 86,4–103,5 %, по результатам 6 повторов.

Корректность при разведении оценивали путём двукратного разведения (1:1) экстрактом холостой пробы шести образцов КК с номинальной концентрацией 3200 нг/мл для МЭЖК с ВПКО 2000 нг/мл и 12 800 нг/мл для МЭЖК с ВПКО 8000 нг/мл. С учётом коэффициента разведения коэффициент вариации рассчитанных концентраций для двукратно разведённых образцов находился в диапазоне 1,4–8,7 %, а процент от номинальной концентрации – 87,6–110,7 %; метод соответствует требованию ±15,0 % по точности и прецизионности.

Матричный эффект в цельной крови человека варьировал от 89,5 % (ДГК, C22:6n-3) до 121,6 % (C20:1n-9) при RSD ≤ 15 % (n=6).

Для оценки степени извлечения применяли подход с вычитанием фонового сигнала при расчете концентраций МЭЖК в тестовых образцах [303]. Приемлемыми считали значения извлечения в пределах ±15 % от ожидаемых концентраций и RSD ≤ 15 % [151]. Для МЭЖК с высоким эндогенным содержанием (C16:0, C18:0, C18:1n-9, C18:2n-6 и C20:4n-6) степень извлечения оценивали только на среднем и верхнем уровнях КК, поскольку увеличение площади фонового пика после внесения стандартов должно составлять не менее 15–20 % от площади фонового пика для обеспечения воспроизводимости [271]. Степень извлечения МЭЖК находилась в диапазоне 87,1–101,6 % при RSD 1,7–13,7 %.

С точки зрения селективности интерференций в образцах цельной крови и эритроцитов, полученных из шести источников, не выявлено. Отклики пиков в холостых и «нулевых» пробах при близких или совпадающих временах удерживания анализируемых МЭЖК не превышали 20 % от уровня НПКО для аналита и 5 % – для внутреннего стандарта. Эффект переноса также отсутствовал в холостых пробах, вводимых после образца уровня ВПКО.

Пики, обусловленные перекрёстными помехами, не наблюдались даже на уровнях ПКО. Это является ожидаемым результатом, поскольку для коллизионной ячейки типа линейной ускоряющей ионной ловушки (LINAC, включая новое поколение – curved LINAC) перекрёстные помехи, как правило, минимальны [181].

Для оценки стабильности в автосамплере готовили по шесть образцов КК на нижнем, среднем и верхнем уровнях КК. Все экстракты переносили во флаконы и хранили в автосамплере при +5 °C. Через 168 ч (7 суток) анализировали свежеприготовленные калибровочные образцы и образцы КК совместно с образцами, хранившимися в автосамплере. Все аналиты сохраняли стабильность на протяжении всего времени хранения в условиях автосамплера: изменение (%change) составляло от –7,7 до 3,5 % для нижнего уровня КК, от –12,1 до 3,3 % для среднего уровня КК и от –12,6 до 6,9 % для верхнего уровня КК при RSD < 15 % [93].

Подтверждённая стабильность рабочих растворов аналитов при комнатной температуре составила 109 суток при изменении от –2,5 до 1,6 % (для внутреннего стандарта – 2,6 % при RSD 5,1 %), а при хранении при 5±3 °C – 112 суток при изменении от –1,6 до 1,5 % (для внутреннего стандарта – 2,9 % при RSD 7,0 %).

Стабильность недавно отобранных образцов цельной крови и эритроцитарной массы оценивали путём сравнения процентного изменения состава ЖК и суммарной доли ЭПК и ДГК (омега-3 индекс) в 6 повторах. Приемлемыми считали изменения менее ±15 % (RSD < 15 %). Образцы цельной крови и эритроцитарной массы сохраняли стабильность в течение 6 ч при комнатной температуре (изменение от –12,0 до 11,2 %), 5 суток при +4 °C (изменение от –13,7 до 12,0 %), после одного цикла замораживания–оттаивания (изменение от –13,4 до

10,3 %) и при хранении 4 недели при –80 °С (изменение от –13,0 до 13,6 %) при RSD < 15 % [93].

3.1.4.2. Сравнение сигналов аддуктов метиловых эфиров жирных кислот $[M+H]^+$ и $[M+NH_4]^+$ при анализе реальных образцов

Образцы цельной крови и эритроцитарной массы от 12 добровольцев анализировали с использованием аддуктов МЭЖК $[M+H]^+$ и $[M+NH_4]^+$, после чего рассчитывали суммарное содержание ЭПК и ДГК от суммарного содержания всех детектируемых ЖК (омега-3 индекс) в цельной крови и эритроцитах.

У пяти добровольцев омега-3 индекс находился в диапазоне 4–8 %, тогда как у семи добровольцев омега-3 индекс превышал 8 %. На основании полученных данных был сделан вывод о корректном выборе диапазонов концентраций для исследуемых МЭЖК (таблица 3.5) [268].

Таблица 3.5 – Суммарное содержание ЭПК и ДГК от суммарного содержания всех детектируемых ЖК (омега-3 индекс) в цельной крови и эритроцитах [93]

№ п/п	Цельная кровь		Эритроциты	
	$[M+NH_4]^+$	$[M+H]^+$	$[M+NH_4]^+$	$[M+H]^+$
1	10,3 %	10,0 %	11,4 %	11,5 %
2	12,3 %	12,2 %	11,1 %	11,0 %
3	12,6 %	12,7 %	12,0 %	12,3 %
4	7,6 %	7,8 %	9,7 %	9,4 %
5	4,1 %	4,3 %	6,1 %	6,0 %
6	7,5 %	7,7 %	9,7 %	10,0 %
7	3,7 %	3,7 %	5,9 %	5,8 %
8	6,6 %	6,6 %	9,4 %	9,6 %
9	5,6 %	5,5 %	7,2 %	7,0 %
10	4,8 %	4,9 %	7,5 %	7,4 %
11	6,9 %	7,1 %	9,5 %	9,3 %
12	7,1 %	7,3 %	7,4 %	7,6 %
Примечание: представлены результаты анализа аддуктов МЭЖК $[M+NH_4]^+$ и $[M+H]^+$.				

Между методами, основанными на регистрации аддуктов МЭЖК $[M+H]^+$ и $[M+NH_4]^+$, выявлена высокая корреляция (r = 0,9986 − цельная кровь; r = 0,9958 –

эритроцитарная масса) при оценке состава ЖК и суммарного содержания ЭПК и ДГК (омега-3 индекс) в цельной крови и эритроцитарной массе. Все точки на графике находятся в пределах верхней и нижней границ согласия (95 % ДИ) по всему диапазону значений омега-3 индекса как для цельной крови, так и для эритроцитарной массы, без видимого систематического смещения (рисунок 3.6 и рисунок 3.7).



Рисунок 3.6 – Диаграмма Бланда–Альтмана, отражающая разность между двумя методами (аддукты $[M+NH_4]^+$ минус аддукты $[M+H]^+$) в зависимости от их среднего значения омега-3 индекса (%) в цельной крови (n = 12) [93]



Рисунок 3.7 – Диаграмма Бланда–Альтмана, отражающая разность между двумя методами (аддукты $[M+NH_4]^+$ минус аддукты $[M+H]^+$) в зависимости от их среднего значения омега-3 индекса (%) в эритроцитах (n = 12) [93]

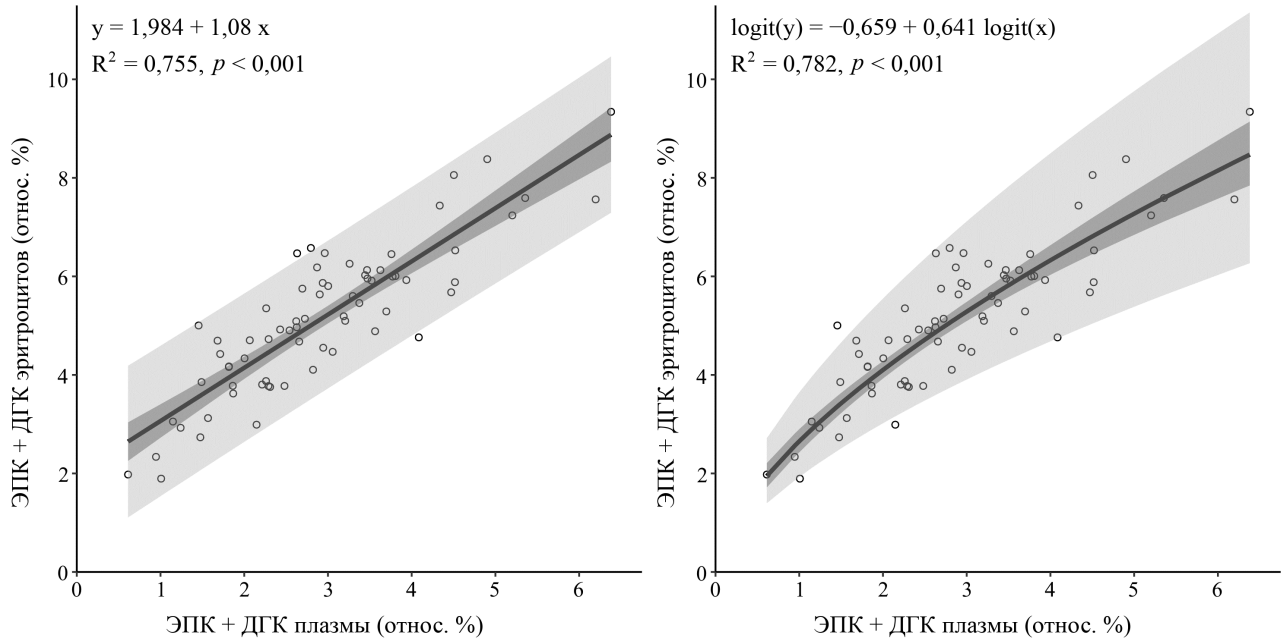
Учитывая существенно более высокий аналитический отклик аммонийных аддуктов NH_4^+ и более высокое отношение сигнал/шум на уровне НПКО, предпочтительным является количественное определение МЭЖК именно для данного типа аддуктов. Данный подход был верифицирован путём сопоставления с определением МЭЖК по протонированным аддуктам H^+, которое является надёжным и чувствительным инструментом для профилирования ЖК [191].

По результатам литературного обзора не удалось обнаружить публикации, в которых был бы описан анализ аммонийных аддуктов МЭЖК методом ВЭЖХ-МС/МС с использованием ЭРИ для определения омега-3 индекса в эритроцитах, несмотря на то, что в липидомике используется анализ липидов различных классов, ЖК и их эфиров в форме аммонийных аддуктов [110, 243, 288]. Хотя имеется лишь одна публикация, предлагающая подход с анализом аммонийных аддуктов МЭЖК для профилирования ЖК в эритроцитах методом ГХ-МС, в ней использован источник химической ионизации, а не ЭРИ [243]. Отсюда можно сделать вывод, что описанный в настоящей работе подход применён впервые.

3.2. Разработка математической модели расчета омега-3 индекса по данным плазмы крови

В продолжение предыдущих исследований K. D. Stark et al. (2016) и X. F. Hu et al. (2017) была изучена взаимосвязь между суммарным содержанием омега-3 ЭПК и ДГК в плазме и эритроцитах [127, 267]. Был применен разработанный в процессе работы метод для анализа образцов плазмы и эритроцитов 69 человек, информация об образцах представлена в таблице 2.1. Математическая модель была построена и проверена с использованием парных образцов плазмы и эритроцитов из репрезентативной когорты российского населения. Аналитический метод ВЭЖХ-МС/МС основан на анализе общего содержания ЖК в плазме и эритроцитах [93].

В исследовании была выявлена выраженная линейная корреляция между уровнями ЭПК и ДГК в плазме и эритроцитах, с коэффициентом детерминации $R^2 = 0{,}755$ ($p < 0{,}001$). Это указывает на то, что эритроцитарный уровень омега-3 может быть с достаточной точностью оценён по данным плазмы с использованием простой линейной модели, что особенно важно в ситуациях, когда измерения в эритроцитах недоступны (рисунок 3.8, слева) [91].

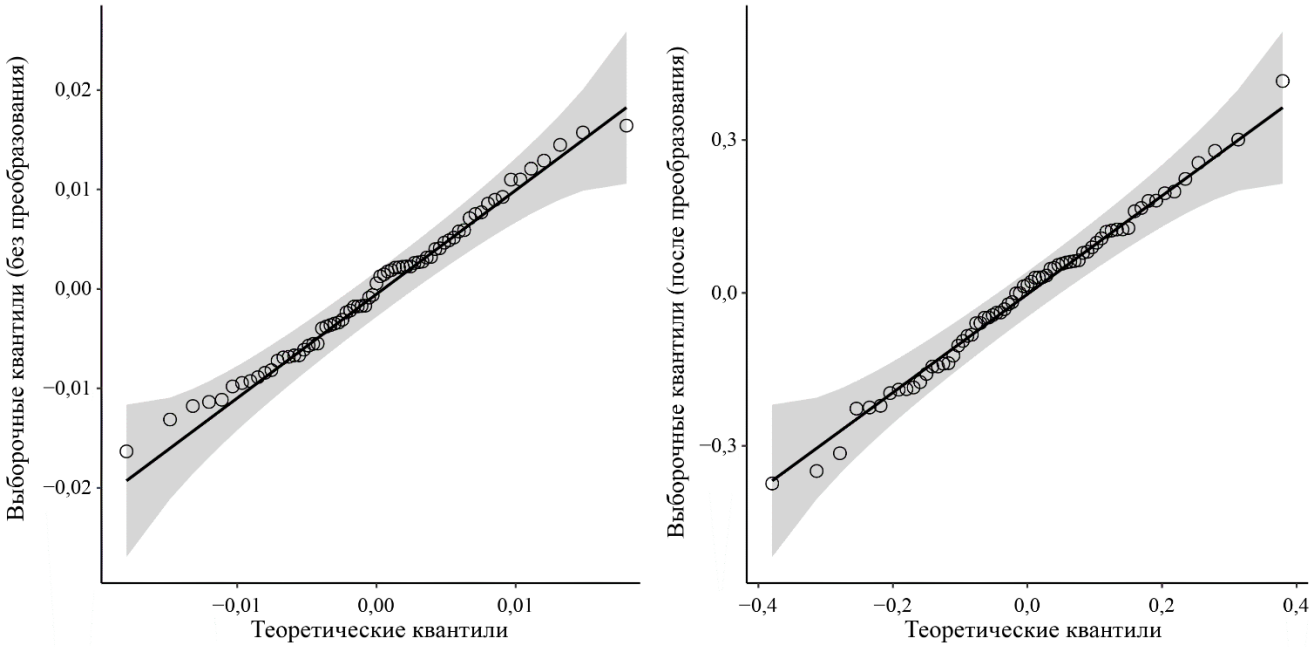


Примечание: логит-преобразование для переменных *y* и *x* определено как logit(y) = ln (y/(100 % − y)) и logit(x) = ln (x/(100 % − x)). Светло-серая область представляет 95 % прогностический интервал; темно-серая область представляет 95 % ДИ (α = 0,05)

Рисунок 3.8 – Линейные регрессионные модели зависимости суммарного содержания ЭПК и ДГК (%) в эритроцитарной фракции от их суммарного содержания в плазме крови, построенные для исходных (слева) и логит-преобразованных (справа) переменных [91]

Точность прогнозирования была повышена за счёт включения в модель логит-преобразованных данных плазмы и эритроцитов, поскольку омега-3 индекс ограничен интервалом от 0 до 1. Линейная регрессионная модель, построенная для логит-преобразованных переменных, продемонстрировала улучшенные результаты, что подтверждалось значением $R^2 = 0{,}782$ (рисунок 3.8, справа) и распределением остатков, более близким к нормальному. Соответствие

нормальности оценивали с помощью Q–Q графиков и теста Шапиро–Уилка (p = 0,97 против 0,76 для исходных данных; рисунок 3.9) [91].



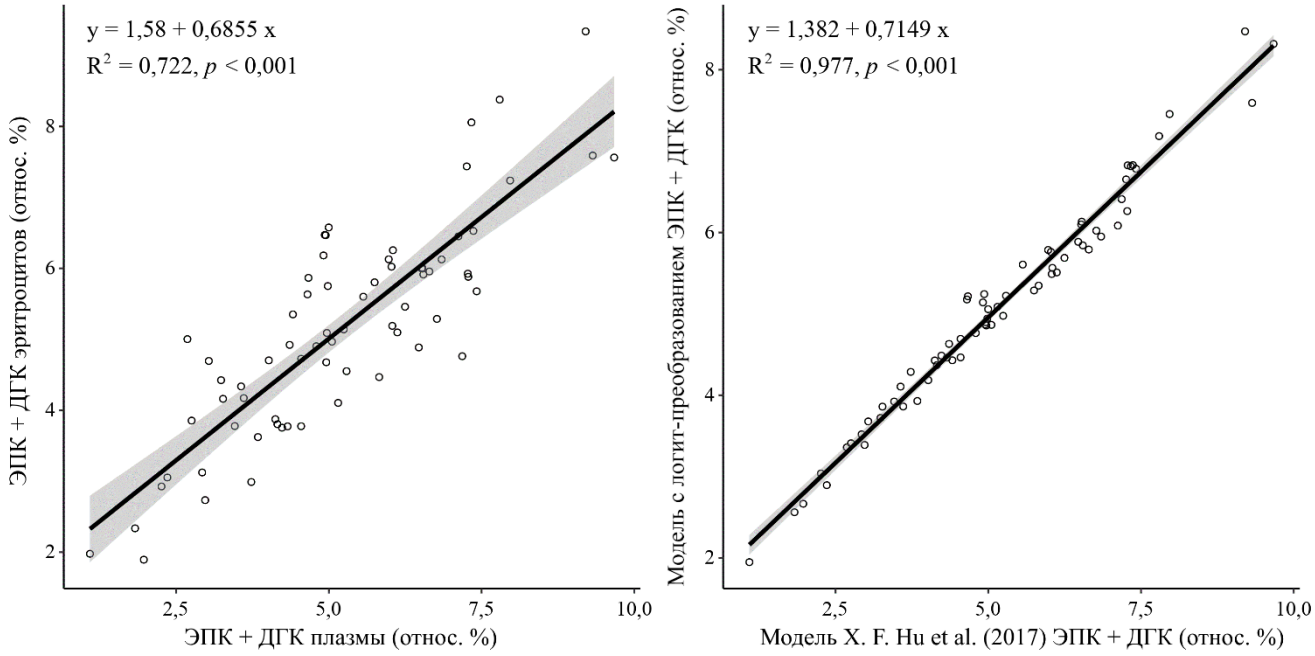
Примечание: регрессионная модель после логит-преобразования данных демонстрирует распределение остатков, более близкое к нормальному, при этом эмпирические (выборочные) квантили точнее соответствуют теоретическим. Сплошная линия представляет собой опорную линию нормального распределения, а серая заштрихованная область указывает на его 95 %-й ДИ (α = 0,05)

Рисунок 3.9 – Q–Q-графики остатков линейной регрессии до (слева) и после (справа) логит-преобразования омега-3 индекса [91]

Модель с логит-преобразованием показала более высокие статистические характеристики. Тем не менее трансформированные данные эритроцитов не в полной мере соответствовали допущению о нормальности распределения, что требует осторожности при интерпретации прогностических интервалов [91].

Результаты прогнозирования, полученные с помощью разработанной в настоящем исследовании регрессионной модели после логит-преобразования данных, сопоставляли с данными мета-регрессионной модели, предложенной X. F. Hu et al. (2017) [127]. При сравнении с омега-3 индексом эритроцитов, измеренным напрямую, модель с логит-преобразованием обеспечила значение R^2 = 0,782 (рисунок 3.8, справа), что отражает высокую объясняющую способность и точность прогноза. В противоположность этому модель X. F. Hu et al. (2017)

демонстрировала R^2 = 0,722, что указывает на несколько более низкое качество аппроксимации на том же наборе данных (рисунок 3.10) [91].



Примечание: светло-серая область соответствует 95 % ДИ (α = 0,05)

Рисунок 3.10 – Сопоставление значений суммарного содержания ЭПК и ДГК (%) в эритроцитарной фракции, рассчитанных по данным плазмы крови с использованием модели X. F. Hu et al. (2017), с результатами непосредственного измерения (слева) и расчета по модели с логит-преобразованием (справа) [91]

Сопоставление расчетных значений, полученных с использованием разработанной модели и модели X. F. Hu et al. (2017) [127], показало высокую степень их соответствия (R^2 = 0,977). Это доказывает адекватность предложенного подхода для измерений и расчетов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что модель с логит-преобразованием является оптимальной для пересчета суммы омега-3 ЭПК и ДГК в плазме крови в омега-3 индекс эритроцитов. Анализ распределения остатков показывает, что разработанная модель обеспечивает меньшие значения ошибок и их гомоскедастичность. Это указывает на снижение систематической погрешности и стабильность точности прогноза во всем диапазоне значений омега-3 индекса [91]. При этом анализ Бланда–Альтмана подтвердил сопоставимую степень согласованности между всеми тремя подходами

(классической линейной моделью, моделью с логит-преобразованием и моделью X. F. Hu et al. (2017) [127]) и эмпирическими данными (таблица 3.6).

Таблица 3.6 – Результат анализа Бланда–Альтмана для трех оцениваемых моделей [91]

Параметр	**Линейная модель**	**Модель с логит-преобразованием**	**Модель X. F. Hu et al. (2017)**
p-значение (для нулевой гипотезы: смещение = 0)	1,00	0,60	0,64
Максимальное значение средних измерений	9,11 %	8,91 %	9,27 %
Минимальное значение средних измерений	2,31 %	1,96 %	1,53 %
Максимальное значение разности измерений	1,64 %	1,65 %	2,32 %
Минимальное значение разности измерений	−1,63 %	−1,65 %	−2,42 %
Систематическое смещение (bias)	0,00 %	0,05 %	−0,06 %
Стандартное отклонение (SD) смещения	0,74 %	0,72 %	0,98 %
Стандартная ошибка (SE) смещения	0,09 %	0,09 %	0,12 %
Стандартная ошибка (SE) границ согласия	0,15 %	0,15 %	0,20 %
Смещение: верхняя граница 95 % ДИ	0,18 %	0,22 %	0,18 %
Смещение: нижняя граница 95 % ДИ	−0,18 %	−0,13 %	−0,29 %
Верхняя граница согласия (+ 1,96 SD)	1,45 %	1,46 %	1,86 %
Верхняя граница согласия: верхний 95 % ДИ	1,76 %	1,76 %	2,27 %
Верхняя граница согласия: нижний 95 % ДИ	1,14 %	1,16 %	1,46 %
Нижняя граница согласия (−1,96 SD)	−1,45 %	−1,37 %	−1,98 %
Нижняя граница согласия: верхний 95 % ДИ	−1,14 %	−1,07 %	−1,57 %
Нижняя граница согласия: нижний 95 % ДИ	−1,76 %	−1,67 %	−2,38 %
Ширина диапазона согласия (размах)	2,90 %	2,83 %	3,84 %

Для всех трёх моделей статистически значимого отличия среднего систематического смещения от нуля не выявлено ($p > 0,05$). Модель с логит-преобразованием демонстрировала незначительное систематическое смещение (0,05 % против 0 % для классической линейной модели), однако величина случайного разброса в ней была несколько ниже (2,83 % против 2,9 % соответственно). Модель X. F. Hu et al. (2017) характеризовалась наибольшим разбросом и смещением (таблица 3.6 и рисунок 3.11) [91].



Примечание: сопоставление измеренных значений эритроцитарной ЭПК+ДГК с результатами линейной модели (слева), модели с логит-преобразованием (в центре) и модели X. F. Hu et al. (2017) (справа)

Рисунок 3.11 – Диаграммы Бланда–Альтмана для трех рассматриваемых моделей [91]

С помощью разработанной модели был оценен омега-3 индекс эритроцитов у пациентов с атеросклерозом на основе значений ЭПК и ДГК в плазме крови. Суммарная концентрация ЭПК и ДГК в плазме крови составила 2,23 % ± 0,58 % (M ± SD), а прогнозируемый индекс омега-3 в эритроцитах – 4,35 % ± 0,72 % (при диапазоне значений от 2,90 % до 6,37 %) [91]. Примечательно, что у 18 испытуемых (34,6 %) расчетный индекс омега-3 был ниже 4 %, что считается пороговым уровнем, ассоциированным со значительным повышением риска развития заболеваний сердечно-сосудистой системы [121]. Полученные результаты указывают на значительную долю пациентов, имеющих неоптимальный статус омега-3 ПНЖК.

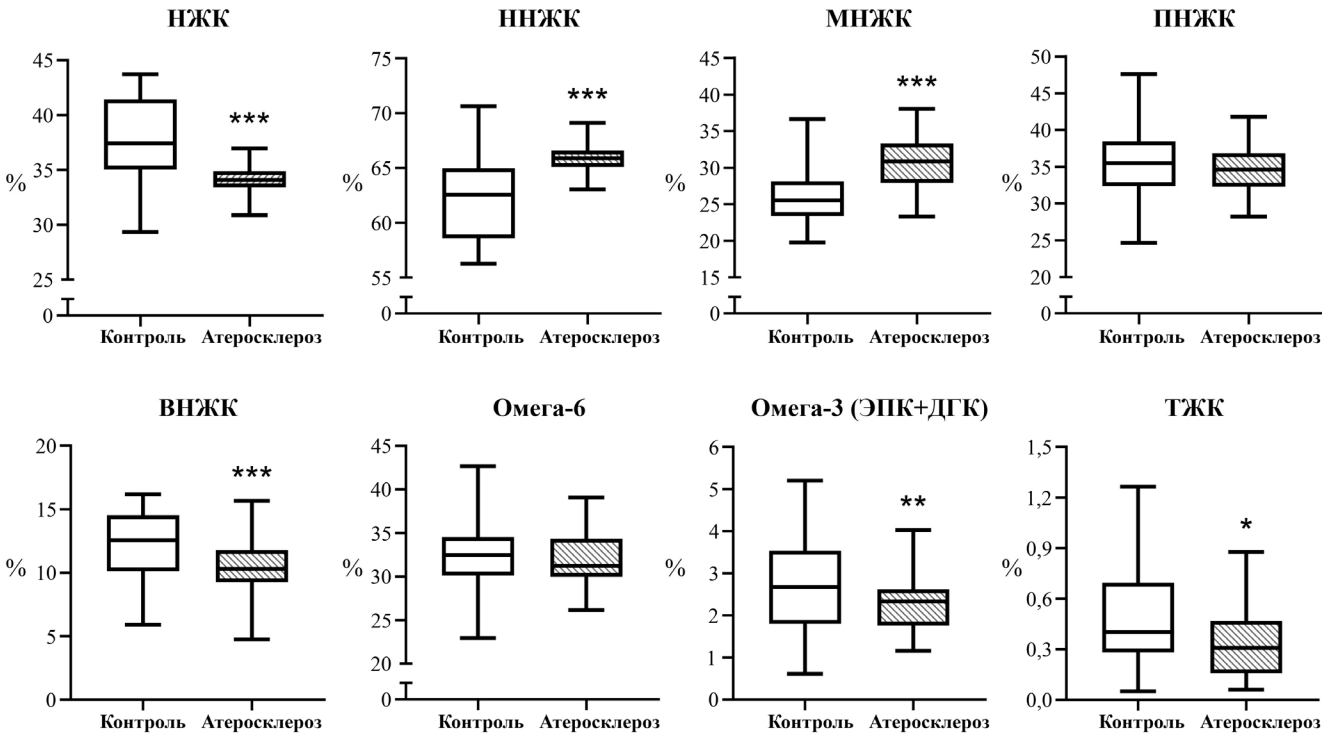
3.3. Сравнительный анализ состава жирных кислот плазмы крови у пациентов с атеросклерозом и лиц контрольной группы

3.3.1. Сравнительная характеристика профиля жирных кислот в группах «Атеросклероз» и «Контроль»

Плазму крови участников контрольной группы и пациентов с атеросклерозом проанализировали и сопоставили по содержанию ЖК. Кроме того, для оценки активности ферментных систем исследовали соотношения «предшественник/ продукт» в метаболических путях НЖК, МНЖК, омега-6 и омега-3 ПНЖК. Сравнительный анализ состава ЖК плазмы выявил ряд статистически значимых различий между лицами контрольной группы (n = 50) и пациентами с атеросклерозом (n = 52).

Содержание НЖК у пациентов с атеросклерозом было значимо ниже (34,04 ± 1,38 %) по сравнению с контролем (37,61 ± 3,88 %; $p < 0,0001$). Напротив, доля суммарных ННЖК была соответственно выше в группе атеросклероза (65,96 ± 1,38 %), чем в контроле (62,40 ± 3,88 %; $p < 0,0001$). Среди ННЖК содержание МНЖК было значимо выше у пациентов с атеросклерозом (30,94 ± 3,50 %), чем у контрольной группы (26,15 ± 3,64 %; $p < 0,0001$), тогда как доля ПНЖК статистически значимо не различалась ($p = 0,2066$) [91].

Содержание высоконенасыщенных ЖК (ВНЖК) было снижено у пациентов с атеросклерозом (10,31 [9,25–11,78]) по сравнению с контролем (12,55 [10,12; 14,52]; $p = 0,0009$). В частности, суммарные уровни омега-3 ЭПК и ДГК были значимо ниже в группе атеросклероза (2,23 ± 0,58 %), чем в контрольной группе (2,70 ± 1,07 %; $p = 0,0068$), что сопровождалось снижением ЭПК (0,42 [0,30; 0,56] против 0,56 [0,34; 0,79]; $p = 0,0159$). Показатели омега-6 ПНЖК между группами статистически значимо не различались. Индекс *транс*-ЖК (ТЖК) был ниже у пациентов с атеросклерозом (0,31 [0,16; 0,47]), чем в контроле (0,40 [0,28; 0,69]; $p < 0,0001$) (рисунок 3.12) [91].



Примечание: звёздочки обозначают статистически значимые различия по сравнению с контрольной группой: * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$). Все значения на рисунке представлены в процентах (%). Диаграммы размаха параметров ТЖК и ВНЖК показывают медиану (Me) и межквартильный диапазон [Q1; Q3]. Для остальных показателей линия внутри диаграмм размаха соответствует среднему значению (M) ± стандартное отклонение (SD)

Рисунок 3.12 – Уровни основных классов ЖК в плазме крови у контрольной группы («Контроль») и пациентов с атеросклерозом («Атеросклероз») [91]

Наблюдаемое у пациентов с атеросклерозом снижение индекса ТЖК представляется противоречащим ожидаемому, поскольку трансжиры исторически ассоциируются с повышенным ССР. Наиболее вероятное объяснение полученных результатов связано не столько с эндогенными метаболическими изменениями, сколько с изменением рациона и образа жизни после установления диагноза и проведением соответствующих вмешательств [184].

Сопоставлены уровни основных классов и отдельных ЖК, стандартные индексы и соотношения «предшественник/продукт», косвенно характеризующие процессы десатурации и элонгации, в контрольной группе (n = 50) и группе пациентов с атеросклерозом (n = 52). Показатели сгруппированы по метаболическим путям НЖК и МНЖК, омега-3 и омега-6 ПНЖК. Описательные статистики и *p*-значения межгрупповых сравнений представлены в таблице 3.7.

Таблица 3.7 – Сравнение молярного процентного содержания ЖК в плазме крови: основные классы ЖК, стандартные индексы и соотношения метаболического баланса [91]

Показатель, %	**Группа 1 Контроль n = 50**	**Группа 2 Атеросклероз n = 52**	***p*-значение**
Основные классы ЖК и уровни омега-3			
НЖК	37,61 ± 3,88	34,04 ± 1,38	< 0,0001
ННЖК	62,40 ± 3,88	65,96 ± 1,38	< 0,0001
МНЖК	26,15 ± 3,64	30,94 ± 3,50	< 0,0001
ПНЖК	35,77 ± 4,47	34,80 ± 3,11	0,2066
ВНЖК	12,55 [10,12; 14,52]	10,31 [9,25; 11,78]	0,0009
Омега-6	32,68 ± 4,07	32,12 ± 3,13	0,4405
ЭПК + ДГК	2,70 ± 1,07	2,23 ± 0,58	0,0068
Омега-3 Индекс	4.92 ± 1.29	4.35 ± 0.72	0,0065
ТЖК	0,40 [0,28; 0,69]	0,31 [0,16; 0,47]	< 0,0001
Путь НЖК, МНЖК			
Отдельные ЖК			
C16:0	26,60 [24,70; 27,91]	25,12 [24,17–26,00]	0,0007
C18:0	9,27 ± 1,83	7,48 ± 0,97	< 0,0001
C20:0	0,19 [0,13; 0,23]	0,19 [0,17; 0,20]	0,6083
C22:0	0,43 [0,33; 0,56]	0,36 [0,32; 0,42]	0,0047
C24:0	0,33 [0,28; 0,44]	0,28 [0,24; 0,33]	0,0009
C16:1n-7	2,19 [1,71; 2,76]	2,12 [1,74; 2,81]	0,8559
C18:1n-9	23,14 ± 3,38	27,92 ± 3,24	< 0,0001
C20:1n-9	0,14 [0,12; 0,18]	0,17 [0,16; 0,20]	< 0,0001
C24:1n-9	0,51 [0,39; 0,77]	0,56 [0,51; 0,64]	0,7668
Индексы на основе соотношений предшественник / продукт			
C16/C16:1n-7	11,88 [10,08; 15,89]	11,92 [8,75; 14,16]	0,5341
C16:0/C18:0	2,78 [2,49; 3,36]	3,34 [3,06; 3,69]	<0 ,0001
C18:1n-9/C20:1n-9	171,20 [131,20; 187,60]	160,80 [145,50; 174,70]	0,4914
C20:1n-9/C24:1n-9	0,27 [0,17; 0,36]	0,28 [0,25; 0,35]	0,1953
C18/C18:1n-9	0,40 [0,29; 0,53]	0,27 [0,23; 0,31]	< 0,0001
C18:0/C20:0	49,73 [41,38; 58,22]	39,77 [36,33; 42,55]	< 0,0001
C20:0/C22:0	0,40 [0,34; 0,46]	0,52 [0,48; 0,58]	< 0,0001
C22:0/C24:0	1,22 [1,14; 1,33]	1,27 [1,23; 1,34]	0,0348
Путь омега-3/омега-6			
Отдельные ЖК			
C18:2n-6, %	22,45 ± 4,74	22,95 ± 3,26	0,5324
C18:3n-6, %	0,81 [0,69; 1,03]	0,98 [0,74; 1,23]	0,0748
C20:3n-6, %	1,31 [1,10; 1,54]	1,14 [0,94; 1,45]	0,0303
C20:4n-6, %	8,06 [6,25; 9,01]	6,29 [5,48; 7,10]	0,0033
C22:4n-6, %	0,16 [0,13; 0,21]	0,17 [0,14; 0,21]	0,2977
ДПК, C22:5n-3, %	0,37 [0,31; 0,45]	0,34 [0,30; 0,38]	0,1115
ЭПК, C20:5n-3, %	0,56 [0,34; 0,79]	0,42 [0,30; 0,56]	0,0159
ДГК, C22:6n-3, %	2,06 [1,34; 2,55]	1,80 [1,40; 2,06]	0,0692

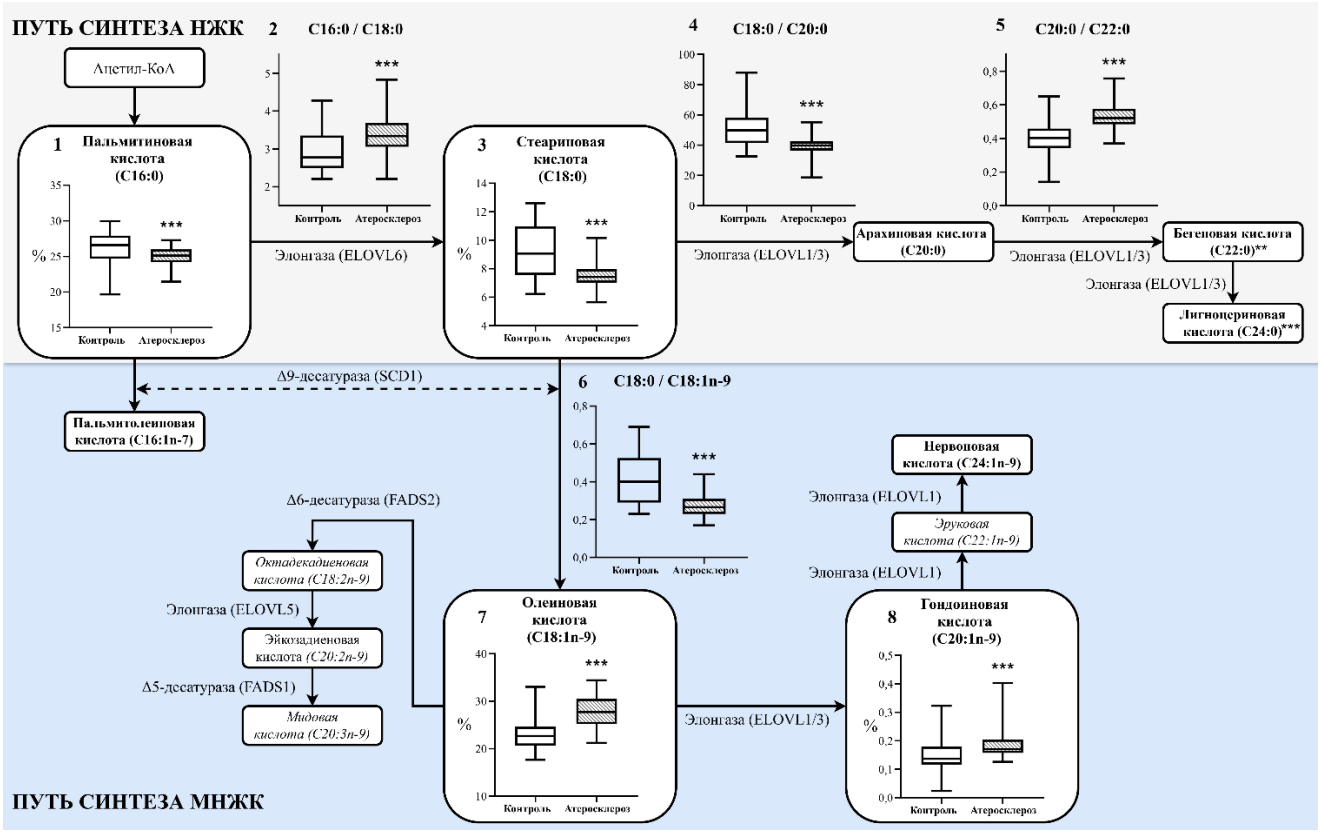
Продолжение Таблицы 3.7

Индексы на основе соотношений предшественник / продукт и прочие			
C18:2n-6/C18:3n-6	25,07 [18,87; 38,00]	22,15 [17,06; 34,22]	0,1718
C18:3n-6/C20:3n-6	1,50 [1,17; 2,09]	0,84 [0,62; 1,07]	< 0,0001
C20:3n-6/C20:4n-6	0,18 [0,14; 0,22]	0,18 [0,14; 0,24]	0,8769
C20:4n-6/C22:4n-6	42,27 [36,56; 50,05]	36,54 [31,24; 43,90]	0,0006
ЭПК/ДПК	1,41 [1,04; 1,84]	1,21 [0,98; 1,49]	0,0371
ДПК/ДГК	0,20 [0,17; 0,23]	0,19 [0,17; 0,23]	0,7566
C18:2n-6/C20:3n-6	17,43 [12,44; 23,49]	19,47 [14,98; 26,50]	0,1226
C18:2n-6/C20:4n-6	2,69 [2,126; 3,584]	3,63 [3,014; 4,513]	0,0054
АК/ЭПК	12,98 [7,47; 18,45]	15,87 [11,45; 20,16]	0,0715
АК/ДПК	20,57 [15,67; 24,73]	19,47 [14,75; 22,40]	0,2423
АК/ДГК	3,77 [3,07; 4,33]	3,40 [2,92; 4,58]	0,6225
АК/ЭПК + ДГК	2,87 [2,16; 3,51]	2,91 [2,27; 3,96]	0,6083
Примечание: для нормально распределённых данных значения представлены в формате Среднее (M) ± стандартное отклонение (SD), для данных с ненормальным распределением – Медиана (Me) и межквартильный диапазон [Q1; Q3].			

Снижение плазменных уровней пальмитиновой (C16:0), стеариновой (C18:0), бегеновой (C22:0) и лигноцериновой (C24:0) кислот у пациентов группы «Атеросклероз» указывает на нарушение процессов элонгации НЖК (p в диапазоне от < 0,0001 до 0,0009) [91]. Изменения соотношений, в частности, повышение отношения C16:0/C18:0 (p < 0,0001) свидетельствуют о снижении эффективности элонгации пальмитата до стеарата, что может отражать уменьшение активности ELOVL6 [115]. Снижение отношения C18:0/C20:0 указывает на уменьшение способности к элонгации стеарата до арахиновой кислоты (C20:0). Повышение отношений C20:0/C22:0 и C22:0/C24:0 отражает поэтапное нарушение элонгации очень длинноцепочечных ЖК, вероятно с вовлечением ELOVL1 и ELOVL3 [175].

В группе «Атеросклероз» отмечались более высокие суммарные уровни МНЖК, что в литературе связывают с повышенной десатуразной активностью. У пациентов наблюдалось значимое повышение уровней олеиновой (C18:1n-9) и гондоиновой (C20:1n-9) кислот (для обеих p < 0,0001). Отношение C18:0/C18:1n-9 было статистически значимо снижено у пациентов группы «Атеросклероз» (0,265 против 0,400; p < 0,0001), что согласуется с предположением о повышенной активности SCD1. SCD1 катализирует десатурацию стеариновой кислоты (C18:0) до олеиновой кислоты (C18:1n-9) [60, 91].

Подробная схема метаболических путей, сопоставляющая состав ЖК в плазме контрольной группы (Контроль) и пациентов с атеросклерозом с фокусом на биосинтез НЖК и МНЖК, представлена на рисунке 3.13.

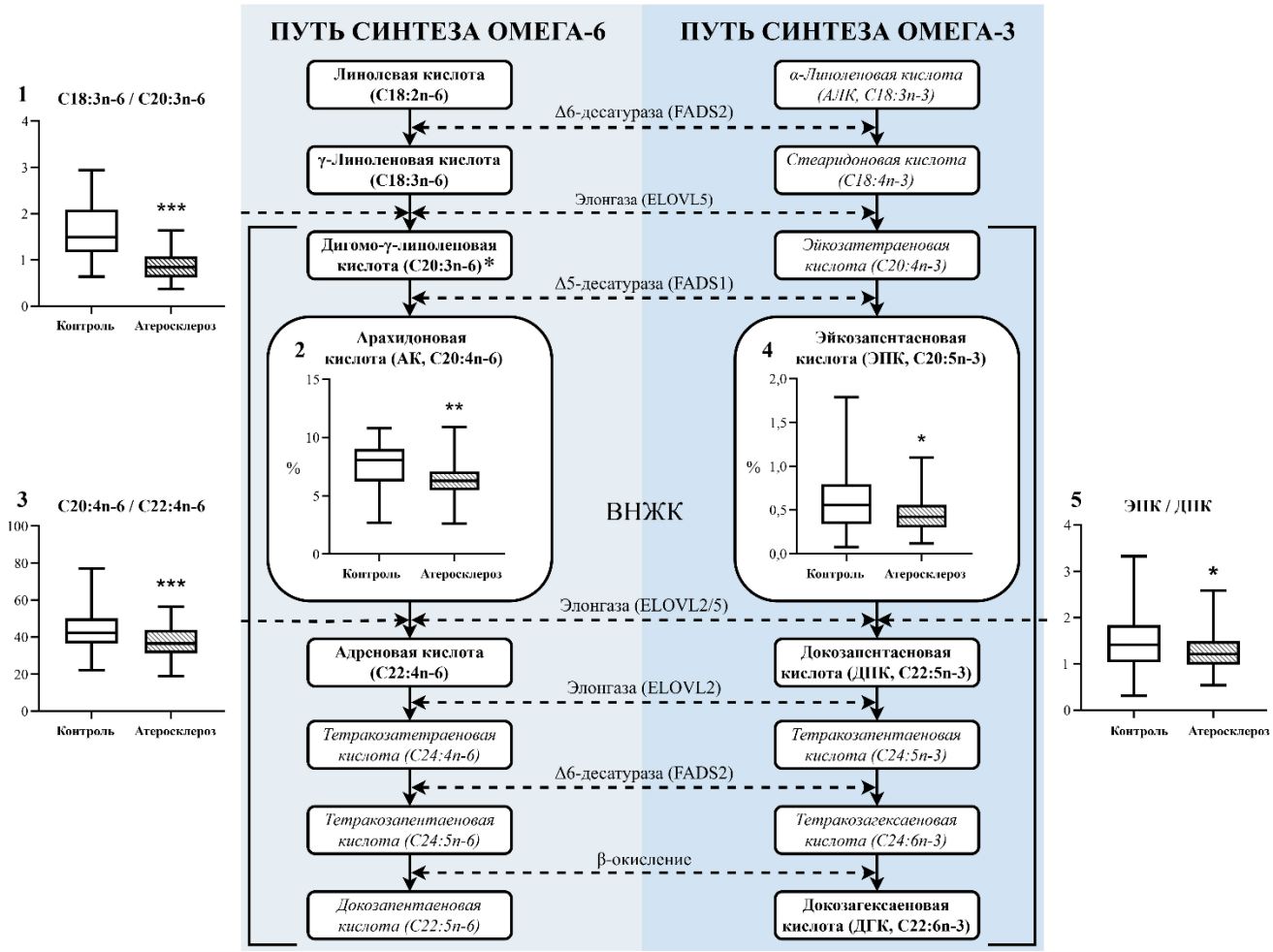


Примечание: 1 − содержание пальмитиновой кислоты (C16:0), %; 2 − соотношение C16:0/C18:0; 3 − содержание стеариновой кислоты (C18:0), %; 4 − соотношение C18:0/C20:0; 5 − соотношение C20:0/C22:0; 6 − соотношение C18:0/C18:1n-9; 7 − содержание олеиновой кислоты (C18:1n-9), %; 8 − содержание гондоиновой кислоты (C20:1n-9), %. Статистически значимые различия обозначены ** ($p < 0,01$) и *** ($p < 0,001$) и оценивались с использованием соответствующего статистического теста. Номенклатура ферментов и представленная метаболическая схема основаны на ранее опубликованных данных [60, 66, 97, 192, 212, 238]. ЖК, определяемые применённым методом ВЭЖХ-МС/МС, выделены жирным шрифтом. Другие ЖК, вовлечённые в метаболизм, приведены курсивом. Содержание ЖК выражено в процентах от общего количества идентифицированных ЖК (%), тогда как все соотношения ЖК (например, C16:0/C18:0) представлены в виде безразмерных величин. Диаграммы размаха для параметров стеариновой кислоты (C18:0) и олеиновой кислоты (C18:1n-9) отражают среднее значение (M) ± стандартное отклонение (SD). Для остальных параметров на диаграммах размаха представлены в виде медианы (Me) и межквартильного диапазона [Q1; Q3]

Рисунок 3.13 – Путь биосинтеза НЖК и МНЖК с графическими данными о составе ЖК в плазме крови контрольной группы («Контроль») и группы «Атеросклероз» [91]

Пути метаболизма омега-3 и омега-6 ПНЖК были проанализированы аналогичным образом. У пациентов с атеросклерозом выявлено статистически

значимое снижение уровней омега-6 ЖК C20:3n-6 и C20:4n-6 (p = 0,0303 и p = 0,0033), а также снижение омега-3 ЭПК (p = 0,0159) на фоне снижения общего уровня омега-3 и изменения соотношения метаболических преобразований (рисунок 3.14) [91].



Примечание: 1 − соотношение C18:3n-6/C20:3n-6; 2 − содержание АК (C20:4n-6), %; 3 − соотношение C20:4n-6/C22:4n-6; 4 − содержание ЭПК, %; 5 − соотношение ЭПК/ДПК. Статистически значимые различия обозначены * (p < 0,05), ** (p < 0,01) и *** (p < 0,001) и оценивались с использованием соответствующего статистического теста. Названия ферментов и схема метаболического пути адаптированы по литературным источникам [89, 213]. ЖК, определяемые применённым методом ВЭЖХ-МС/МС, выделены жирным шрифтом. Другие ЖК, вовлечённые в метаболизм, приведены курсивом. Содержание ЖК выражено в процентах от общего количества идентифицированных ЖК (%), тогда как все соотношения ЖК (например, ЭПК/ДГК) представлены в виде безразмерных величин. Все диаграммы размаха отражают медиану (Me) и межквартильный диапазон [Q1; Q3]

Рисунок 3.14 – Биосинтетический путь омега-3 и омега-6 ЖК с графическими данными о составе ЖК в плазме крови контрольной группы («Контроль») и группы «Атеросклероз» [91]

Снижение уровней C20:3n-6 и C20:4n-6 позволяет обсуждать изменения пути синтеза длинноцепочечных омега-6 ПНЖК с участием FADS1, катализирующей превращение дигомо-γ-линоленовой кислоты (C20:3n-6) в АК (C20:4n-6) [180, 197]. Наблюдаемое снижение ЭПК и общего уровня омега-3, а также уменьшение отношения ЭПК/ДПК свидетельствуют о нарушении процессов элонгации омега-3 ПНЖК с вовлечением элонгаз ELOVL2 и ELOVL5 [175]. У пациентов группы «Атеросклероз» отношение C18:3n-6 к C20:3n-6 было статистически значимо снижено. При этом уровни C18:2n-6 и C18:3n-6 оставались стабильными, что указывает на нарушение элонгации γ-линоленовой кислоты (C18:3n-6) до дигомо-γ-линоленовой кислоты (C20:3n-6), вероятно вследствие снижения активности элонгазы ELOVL5, а не за счёт уменьшения функции Δ6-десатуразы (FADS2) [42]. Вместе с тем, в группе «Атеросклероз» отмечалась тенденция к снижению средних значений ЖК, образующихся «ниже» C18:3n-6, однако она не достигала статистической значимости. Отношение C18:2n-6/C20:4n-6 было статистически значимо выше в группе «Атеросклероз» ($p = 0,0054$), что косвенно указывает на снижение активности FADS2 [180]. Более низкие уровни ВНЖК в сочетании с измененными соотношениями омега-6 (например, C20:4n-6/C22:4n-6) указывают на то, что процессы элонгации и десатурации липидов были значительно нарушены [149].

3.3.2. Оценка профиля жирных кислот плазмы крови при атеросклерозе в зависимости от применения аторвастатина и розувастатина

Для косвенной оценки изменений активности ферментов десатураз и элонгаз при атеросклерозе были выбраны отдельные НЖК и МНЖК омега-9, а также омега-3 и омега-6 ПНЖК и их соотношения [91, 92]. Показатели сопоставляли между контрольной группой и подгруппами пациентов, получавших аторвастатин, розувастатин или не получавших статины. Значения показателей и статистически значимые различия при попарных сравнениях представлены в таблице 3.8.

Таблица 3.8 – Среднее молярное процентное содержание отдельных ЖК, их соотношения и производные индексы в плазме крови четырех исследуемых групп [92]

Параметры	**Группа, количество**			
	Контроль, n = 50	**Атеросклероз, аторвастатин, n = 19**	**Атеросклероз, розувастатин, n = 21**	**Атеросклероз, без статинов, n = 12**
Определенные ЖК: НЖК, МНЖК, омега-6, -3 ПНЖК				
C18:0	9,27 ± 1,83 [2,3,4]	7,42 ± 0,93 [1]	7,45 ± 0,96 [1]	7,45 ± 1,01 [1]
C18:1n-9	23,13 ± 3,38 [2,3,4]	27,33 ± 2,75 [1]	28,49 ± 3,49 [1]	28,01 ± 3,66 [1]
C20:3n-6	1,31 ± 0,31	1,18 ± 0,41	1,15 ± 0,29	1,20 ± 0,35
АК, C20:4n-6	7,53 ± 1,99 [2,3]	6,56 ± 1,49 [1]	6,19 ± 1,79 [1]	6,67 ± 1,61
АДК, C22:4n-6	0,17 ± 0,06	0,19 ± 0,06	0,17 ± 0,04	0,19 ± 0,05
ДПК, C22:5n-3	0,38 ± 0,10 [4]	0,39 ± 0,12	0,34 ± 0,07	0,32 ± 0,06 [1]
ЭПК, C20:5n-3	0,59 ± 0,32 [3,4]	0,49 ± 0,26	0,45 ± 0,21 [1]	0,41 ± 0,19 [1]
ДГК, C22:6n-3	1,97 ± 0,68 [4]	1,84 ± 0,48	1,77 ± 0,39	1,66 ± 0,34 [1]
Индексы и соотношения				
Омега-3 статус	2,70 ± 1,07 [3,4]	2,33 ± 0,71	2,22 ± 0,50 [1]	2,06 ± 0,50 [1]
Омега-6/омега-3	11,63 ± 4,57 [4]	13,23 ± 4,94	12,90 ± 2,86	14,05 ± 2,60 [1]
АК/ЭПК	13,80 ± 7,92	15,47 ± 8,01	16,14 ± 7,49	19,36 ± 7,99
ЭПК/ДПК	1,48 ± 0,58 [2]	1,21 ± 0,38 [1]	1,33 ± 0,47	1,20 ± 0,38
ДПК/ДГК	0,20 ± 0,04	0,21 ± 0,04 [3]	0,18 ± 0,04 [2]	0,20 ± 0,04
ЭПК/ДГК	0,32 ± 0,13 [2,3,4]	0,25 ± 0,08 [1]	0,23 ± 0,07 [1]	0,24 ± 0,08 [1]
C18:0/C18:1n-9	0,42 ± 0,13 [2,3,4]	0,28 ± 0,05 [1]	0,27 ± 0,06 [1]	0,27 ± 0,07 [1]
C20:4n-6/C22:4n-6	45,14 ± 12,84 [2,3,4]	36,05 ± 5,46 [1]	37,39 ± 8,64 [1]	37,01 ± 9,46 [1]
ИБ о-6/о-3	12,00 ± 4,94 [1]	8,35 ± 2,56 [1]	7,91 ± 2,05 [1]	8,13 ± 3,32 [1]

Примечание: выбранные параметры статистически значимо различаются ($p < 0.05$): индексы [1], [2], [3], [4] обозначают значимость различий при попарном сравнении соответственно с контрольной группой, группой атеросклероза на терапии аторвастатином, группой атеросклероза на терапии розувастатином и группой атеросклероза без терапии статинами. Значения представлены в формате среднее (M) ± стандартное отклонение (SD). Подробная информация об ИБ о-6/о-3 будет представлена в разделе 3.5.

Среди НЖК и МНЖК в настоящем исследовании основное внимание было уделено стеариновой кислоте (C18:0) и олеиновой кислоте (C18:1n-9), для которых выявлялись статистически значимые межгрупповые различия. Концентрации стеариновой кислоты были значительно ниже в группе «Атеросклероз» по сравнению с контролем ($p < 0,0001$), тогда как концентрации олеиновой кислоты были выше в группе «Атеросклероз» ($p < 0,0001$); отношение C18:0/C18:1n-9 у пациентов с атеросклерозом было снижено ($p < 0,0001$) [92].

Также в этом исследовании особое внимание было АК, которая является ключевой омега-6 ЖК [284]. Её уровни были статистически значимо ниже в группе атеросклероза (Атеросклероз) по сравнению с контрольной группой ($p = 0,0033$). Кроме того, анализировался её предшественник дигомо-γ-линоленовая кислота

(C20:3n-6), уровни которой также были статистически значимо ниже в объединённой группе «Атеросклероз» (p = 0,0303). Также оценивали уровни АДК, образующейся из АК при участии ферментов ELOVL2 и 5. Хотя её содержание статистически значимо не различалось между группами (p = 0,2977), отношение C20:4n-6 к C22:4n-6 было существенно ниже в группе «Атеросклероз» (p = 0,0006). В отличие от этого, отношение C20:3n-6 к C20:4n-6 не демонстрировало значимых различий между группами (p = 0,8769) [92].

Также тщательно исследовались ключевые омега-3 ЖК ЭПК, ДПК и ДГК. Уровни ЭПК были статистически значимо ниже в группе «Атеросклероз» по сравнению с контролем (p = 0,0159). Напротив, уровни ДПК (p = 0,1115) и ДГК (p = 0,0692) значимо не различались между группами. Однако, как отношение ЭПК/ДПК (p = 0,0371), так и отношение ЭПК/ДГК (p = 0,0012) были статистически значимо ниже в группе «Атеросклероз». Отношение ДПК/ДГК значимых различий не показало [92].

Далее оценивали содержания и соотношения перечисленных выше ЖК (C18:0, C18:1n-9, C20:3n-6, C20:4n-6, C22:4n-6, ЭПК, ДПК и ДГК) в рамках сравнения четырёх групп: контрольная группа и пациенты с каротидным атеросклерозом, получавшие аторвастатин или розувастатин, либо не получавшие терапию статинами.

В подгрупповом анализе четырёх когорт содержание стеариновой кислоты (C18:0; НЖК) было ниже во всех подгруппах пациентов по сравнению с контрольной группой (контрольная группа по сравнению с пациентами, получавшими аторвастатин: p = 0,0024; контрольная группа по сравнению с пациентами, получавшими розувастатин: p = 0,0006; контрольная группа по сравнению с пациентами без терапии статинами: p = 0,0010), при этом различий между тремя подгруппами пациентов не выявлено (во всех случаях $p > 0,99$). Напротив, содержание олеиновой кислоты (C18:1n-9; МНЖК) было выше во всех подгруппах пациентов по сравнению с контрольной группой ($p < 0,0001$ для подгрупп аторвастатина и розувастатина; p = 0,0047 для подгруппы без терапии статинами); различий между подгруппами пациентов также не отмечено ($p \geq 0,58$). Аналогичным образом отношение C18:0/C18:1n-9 было выше в контрольной

группе по сравнению со всеми подгруппами пациентов (во всех случаях $p < 0,0001$) и не различалось между подгруппами пациентов ($p \geq 0,68$) [92].

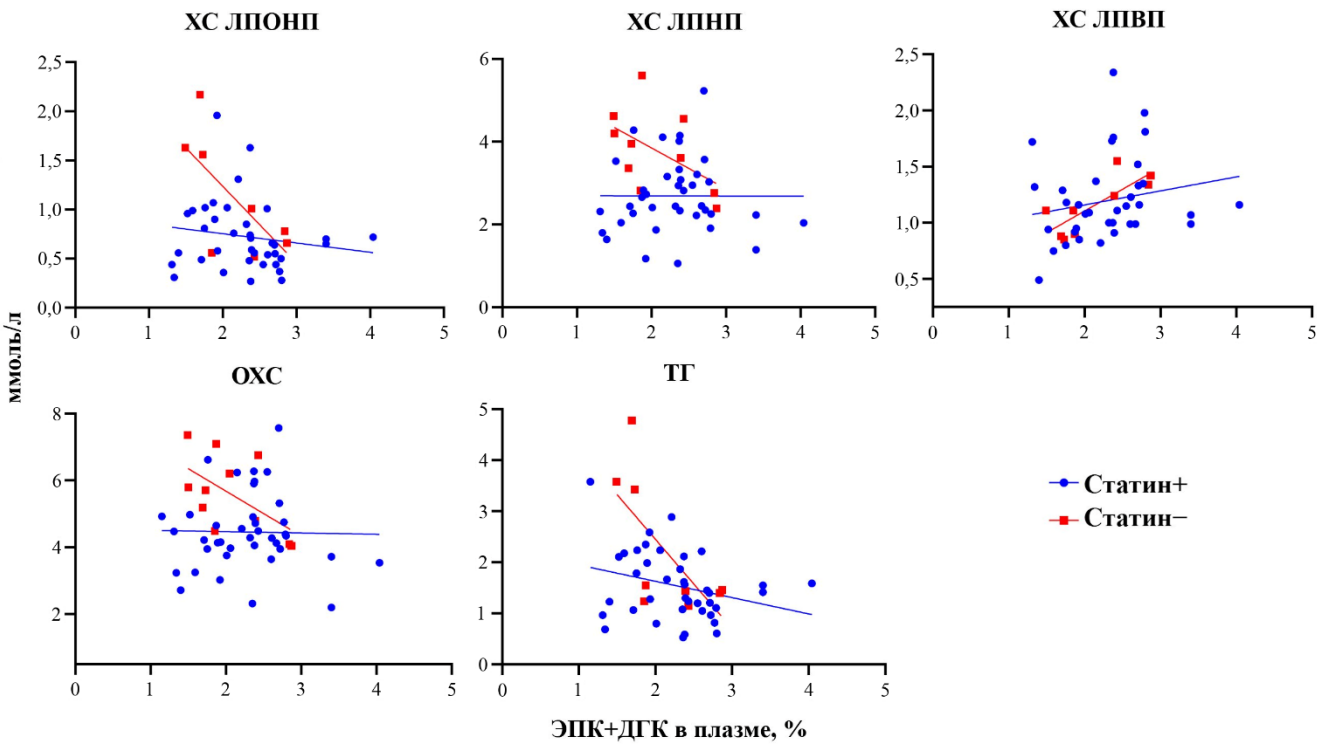
Что касается омега-6 ПНЖК, уровень C20:3n-6 показал тенденцию к снижению во всех подгруппах атеросклероза по сравнению с контрольной группой. Ни одно из групповых различий не достигло статистической значимости ($p > 0,05$), хотя среднее значение в группе розувастатина было самым низким среди всех групп. В отличие от этого, уровни АК были статистически значимо ниже у пациентов, получавших аторвастатин ($p = 0,0342$) и розувастатин ($p = 0,0080$), по сравнению с контрольной группой, тогда как у пациентов без терапии статинами статистически значимых различий не выявлено. Для АДК статистически значимых межгрупповых различий не обнаружено [92].

Среди омега-3 ПНЖК уровни ЭПК были статистически значимо ниже у пациентов, получавших розувастатин ($p = 0,0488$), а также у пациентов без терапии статинами ($p = 0,0224$), по сравнению с контрольной группой; в подгруппе аторвастатина статистически значимого снижения ЭПК не отмечено. Уровни ДПК были статистически значимо ниже только в подгруппе без терапии статинами ($p = 0,0302$). Уровень ДГК был статистически значимо ниже у пациентов без терапии статинами по сравнению с контрольной группой ($p = 0,0334$), тогда как у пациентов, получавших статины, статистически значимых различий по ДГК не выявлено [92].

При анализе соотношений, отражающих активность метаболических путей, отношение C20:4n-6/C22:4n-6 было статистически значимо ниже во всех трёх подгруппах атеросклероза по сравнению с контрольной группой (для всех сравнений $p < 0,05$), что указывает на снижение эффективности удлинения АК. Отношение C20:3n-6/C20:4n-6 статистически значимо между группами не различалось. Среди индексов, связанных с омега-3, отношение ЭПК/ДГК было статистически значимо ниже во всех подгруппах атеросклероза (для всех сравнений $p < 0,05$), тогда как отношение ЭПК/ДПК было статистически значимо ниже только в подгруппе аторвастатина ($p = 0,0290$). Отношение ДПК/ДГК в большинстве сравнений статистически значимо не различалось, за исключением умеренного, но статистически значимого увеличения в подгруппе аторвастатина по сравнению с подгруппой розувастатина ($p = 0,0206$) [92].

3.3.3. Связь липидного профиля с омега-3 статусом и терапией статинами

Была изучена связь уровней омега-3 ЖК с показателями липидного обмена, включая ХС ЛПОНП, ХС ЛПНП, ХС ЛПВП, ОХС и ТГ у пациентов, получавших терапию статинами (группа «Статин+», n = 40), и пациентов, ранее не получавших терапию статинами (группа «Статин−», n = 12). Были построены попарные корреляции уровней омега-3 ЖК с показателями стандартного липидного профиля в подгруппах «Статин+» и «Статин−» с использованием линейной регрессии (рисунок 3.15).



Примечание: ХС ЛПОНП: ««Статин+»» $R^2 = 0{,}024$; $p = 0{,}357$ vs «Статин−» $R^2 = 0{,}485$; $p = 0{,}055$; ХС ЛПНП: «Статин+» $R^2 < 0{,}001$; $p = 0{,}989$ vs «Статин−» $R^2 = 0{,}271$; $p = 0{,}123$; ХС ЛПВП: «Статин+» $R^2 = 0{,}035$; $p = 0{,}265$ vs «Статин−» $R^2 = 0{,}626$; $p = 0{,}011$; ОХС: «Статин+» $R^2 = 0{,}0004$; $p = 0{,}902$ vs «Статин−» $R^2 = 0{,}322$; $p = 0{,}069$; ТГ: «Статин+» $R^2 = 0{,}082$; $p = 0{,}077$ vs «Статин−» $R^2 = 0{,}453$; $p = 0{,}047$

Рисунок 3.15 – Корреляция между уровнем омега-3 ЖК и липидными маркерами (ХС ЛПОНП, ХС ЛПНП, ХС ЛПВП, ОХС и ТГ) у пациентов, получающих терапию статинами («Статин+», n = 40), и у пациентов, ранее не получавших терапию статинами («Статин−», n = 12) [91]

ХС ЛПОНП. У пациентов, получавших терапию статинами, суммарные уровни омега-3 ЭПК и ДГК демонстрировали слабую и статистически незначимую обратную корреляцию с ХС ЛПОНП (R^2 = 0,024; p = 0,357). Потенциальным объяснением данного наблюдения может служить доминирующее действие статинов, связанное с ингибированием печёночного синтеза ХС и липопротеинов. В подгруппе «Статин−» также выявлялась обратная связь между омега-3 ЖК и ХС ЛПОНП (R^2 = 0,485; p = 0,055), однако эта ассоциация не достигала статистической значимости. Вместе с тем, данное направление связи согласуется с описанными механизмами снижения ЛПОНП под влиянием омега-3 ЖК, включающими уменьшение печёночного липогенеза и усиление β-окисления [196].

ХС ЛПНП. В группе «Статин+» статистически значимой корреляции между уровнем омега-3 и ХС ЛПНП не выявлено (R^2 < 0,001; p = 0,989), что, вероятно, обусловлено доминирующим механизмом снижения ЛПНП при терапии статинами за счёт ингибирования ГМГ-КоА-редуктазы. В группе «Статин−» наблюдалась обратная зависимость, не достигшая статистической значимости (R^2 = 0,271; p = 0,123). Это может указывать на потенциальное, хотя и ограниченное, влияние омега-3 ЖК на размер частиц ЛПНП и процессы печёночного клиренса [159, 279].

ХС ЛПВП. В группе «Статин+» уровни омега-3 демонстрировали слабую и статистически незначимую корреляцию с ХС ЛПВП (R^2 = 0,035; p = 0,265). Напротив, у пациентов группы «Статин−» была выявлена выраженная и статистически значимая положительная корреляция между уровнем омега-3 и ХС ЛПВП (R^2 = 0,626; p = 0,011). Это позволяет предположить, что ЭПК и ДГК кислоты могут улучшать функциональные свойства ЛПВП за счёт усиления эффлюкса ХС и повышения экспрессии аполипопротеина A-I [154].

ОХС. У пациентов «Статин+» корреляция между омега-3 и ОХС не наблюдалась (R^2 = 0,0004; p = 0,902), что указывает на преимущественно статин-зависимую детерминацию уровня ХС. В группе «Статин−» отмечалась

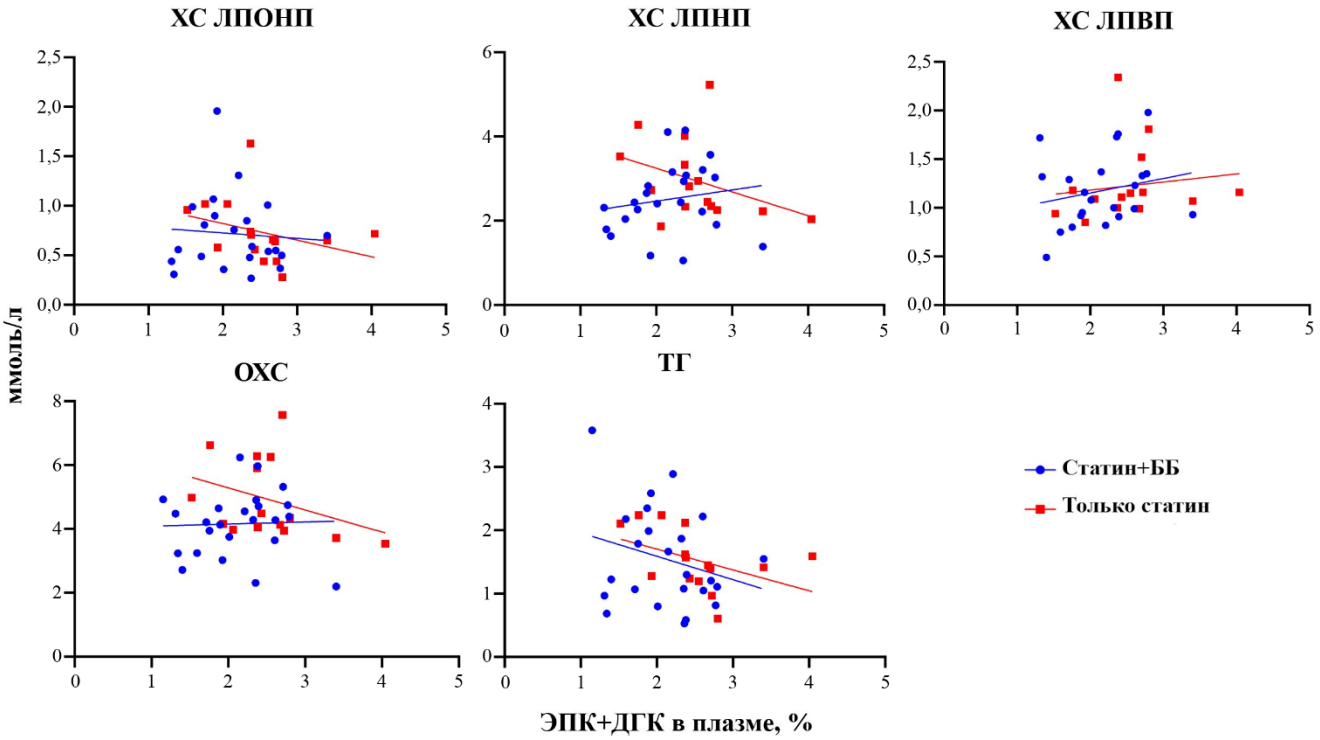
умеренная отрицательная тенденция (R^2 = 0,322; p = 0,069), что может свидетельствовать о потенциальной способности омега-3 ЖК снижать ОХС за счёт влияния на липогенез и клиренс ХС [132].

ТГ. В группе Статин+ не было статистически значимой связи между омега-3 ЖК и уровнем ТГ (R^2 = 0,082; p = 0,077). В группе «Статин−» связь была умеренной и статистически значимой, что согласуется с данными о том, что омега-3 ЭПК и ДГК могут снижать концентрацию ТГ в крови (R^2 = 0,453; p = 0,047) [132].

В подгруппе пациентов, получавших терапию статинами (n = 40), при сборе фармакологического анамнеза зафиксирован приём ряда препаратов с потенциальным влиянием на показатели липидного обмена: β-адреноблокаторы (n = 25), тиазидные диуретики (гидрохлоротиазид, n = 3), петлевые диуретики (торасемид, n = 2), тиазидоподобные диуретики (индапамид, n = 6) и ингибиторы ксантиноксидазы (аллопуринол, n = 5). Из перечисленных классов наибольшую частоту применения имели β-адреноблокаторы (62,5 % подгруппы Статин+), что определило их выбор для отдельного анализа. Прочие препараты при значительно меньшей частоте применения отдельно не анализировались ввиду недостаточного объёма соответствующих подгрупп [91].

Для оценки потенциального модифицирующего влияния приёма β-адреноблокаторов на ассоциации между омега-3 статусом плазмы (сумма ЭПК и ДГК) и показателями стандартного липидного профиля проведён корреляционный анализ в подгруппах «Статин + ББ» (n = 25) и «Только статин» (n = 15).

Ни в одной из пяти оцениваемых пар (сумма ЭПК и ДГК с ХС ЛПОНП, ХС ЛПНП, ХС ЛПВП, ОХС, ТГ) коэффициент детерминации R^2 не достигал статистической значимости в обеих подгруппах. Результаты представлены на рисунке 3.16.



Примечание: ХС ЛПОНП: «Статин+ББ» $R^2 = 0{,}006$; $p = 0{,}736$ vs «Только терапия статинами» $R^2 = 0{,}105$; $p = 0{,}240$; ХС ЛПНП: «Статин+ББ» $R^2 = 0{,}028$; $p = 0{,}443$ vs «Только терапия статинами» $R^2 = 0{,}137$; $p = 0{,}174$; ХС ЛПВП: «Статин+ББ» $R^2 = 0{,}045$; $p = 0{,}341$ vs «Только терапия статинами» $R^2 = 0{,}018$; $p = 0{,}635$; ОХС: «Статин+ББ» $R^2 < 0{,}002$; $p = 0{,}869$ vs «Только терапия статинами» $R^2 = 0{,}117$; $p = 0{,}211$; ТГ: «Статин+ББ» $R^2 = 0{,}069$; $p = 0{,}217$ vs «Только терапия статинами» $R^2 = 0{,}188$; $p = 0{,}107$

Рисунок 3.16 – Корреляция между уровнем омега-3 ЖК и липидными маркерами (ХС ЛПОНП, ХС ЛПНП, ХС ЛПВП, ОХС и ТГ) с учётом приёма β-блокаторов, с формированием групп «Терапия статинами + β-адреноблокаторы» (Статин+ББ, n = 25) и «Только терапия статинами» (Только статин, n = 15) [91]

Описательное сравнение указывает на то, что ни приём β-адреноблокаторов в составе комбинированной терапии, ни изолированная терапия статинами в данной выборке не сопровождались статистически значимыми ассоциациями уровней омега-3 ЖК с показателями стандартного липидного профиля. Полученный результат согласуется с представлением о ведущей роли терапии статинами в формировании наблюдаемого ослабления омега-3 ассоциаций (см. сопоставление подгрупп «Статин+» и «Статин−» выше). При этом ввиду ограниченного объёма обеих подгрупп статистическая мощность анализа недостаточна для строгого подтверждения отсутствия модифицирующего влияния β-адреноблокаторов [91].

Для дополнительной клинико-фармакологической характеристики группы пациентов с атеросклерозом брахиоцефальных артерий была проведена оценка назначенной терапии статинами и достигнутых уровней ХС ЛПНП. Терапию статинами получали 40 из 52 пациентов (76,9 %): 19 пациентов получали аторвастатин, 21 пациент – розувастатин; 12 пациентов не получали терапию статинами [92]. С учетом наличия гемодинамически значимого атеросклеротического поражения брахиоцефальных артерий пациенты были отнесены к категории очень высокого сердечно-сосудистого риска. Согласно европейским и российским клиническим рекомендациям, для данной категории целевым уровнем ХС ЛПНП является значение < 1,4 ммоль/л [7].

Среди пациентов, получавших терапию статинами, высокая и умеренная интенсивность терапии встречались с одинаковой частотой (20 и 20 пациентов соответственно). К терапии высокой интенсивности относили аторвастатин в дозах 40–80 мг/сут и розувастатин в дозах 20–40 мг/сут; к терапии умеренной интенсивности – аторвастатин 10–20 мг/сут и розувастатин 5–10 мг/сут [7].

Целевого уровня ХС ЛПНП < 1,4 ммоль/л достигли 3 из 40 пациентов (7,5 %), получавших терапию статинами. Медиана ХС ЛПНП в данной подгруппе составила 2,56 [2,23; 3,24] ммоль/л. При повторной стратификации 40 пациентов, получавших терапию статинами, по интенсивности терапии целевого уровня ХС ЛПНП < 1,4 ммоль/л достигли 2 из 20 (10,0 %) в подгруппе высокой интенсивности (медиана 2,45 [2,18; 3,63] ммоль/л) и 1 из 20 (5,0 %) в подгруппе умеренной интенсивности (медиана 2,70 [2,25; 3,07] ммоль/л) (Приложение А, Таблица А.2).

При терапии аторвастатином целевой уровень был достигнут у 1 из 19 пациентов (5,3 %), при терапии розувастатином – у 2 из 21 пациента (9,5 %). Эти данные свидетельствуют о преимущественном недостижении целевого уровня ХС ЛПНП в исследуемой когорте пациентов очень высокого сердечно-сосудистого риска [7].

3.4. Сравнительная информативность показателей профиля жирных кислот при терапии статинами

Различия содержания отдельных ЖК между контрольной группой и подгруппами пациентов с атеросклерозом (таблица 3.8) отражают отдельные метаболические сдвиги, но не дают комплексного представления об изменениях взаимосвязанных путей обмена ЖК. Для этого используют расчётные показатели, объединяющие содержание нескольких ЖК или их соотношения [144]. Их дискриминирующую способность оценивали с помощью ROC-анализа при сравнении каждой подгруппы с контролем, уделяя особое внимание сохранению информативности при терапии статинами.

Для сравнения были выбраны широко используемые параметры: Омега-3 статус, АК/ЭПК и отношение омега-6/омега-3 (суммарные омега-6/суммарные омега-3 ЖК) [81], а также соотношения C18:0/C18:1n-9 и C20:4n-6/C22:4n-6, продемонстрировавшие статистически значимые межгрупповые различия, и новый ИБ о-6/о-3, подробно описанный в разделе 3.5. Дискриминирующую способность показателей оценивали по значениям AUC, которые интерпретировали по принятой экспертной шкале: неудовлетворительная (AUC < 0,60), средняя/удовлетворительная (0,60–0,69) и хорошая (AUC ≥ 0,70) [92].

Было установлено, что соотношение C18:0/C18:1n-9 обладает стабильной и достоверной дискриминирующей способностью во всех парных сравнениях. При сравнении контрольной группы с группой пациентов, получавших аторвастатин, AUC составила 0,835 (SE (стандартная ошибка) = 0,048; 95 % ДИ 0,740–0,929; p < 0,0001), тогда как при сравнении контрольной группы с группой пациентов, получавших розувастатин, AUC была 0,858 (SE = 0,046; 95 % ДИ 0,768–0,949; p < 0,0001), что указывает на высокую дискриминирующую способность показателя в обоих сравнениях. При сравнении контрольной группы с группой пациентов без терапии статинами также получены высокие показатели для соотношения C18:0/C18:1n-9: AUC = 0,831 (SE = 0,065; 95 % ДИ 0,704–0,958; p = 0,0006) (таблица 3.9) [92].

Таблица 3.9 – Площадь под ROC-кривой (AUC), 95 % ДИ и *p*-значения (критерий Вальда) для каждого параметра на основе ЖК плазмы крови при сравнении каждой из трёх групп пациентов с атеросклерозом с контрольной группой [92]

Группа	**Параметр**	**Омега-3 статус**	**АК/ЭПК**	**Омега-6/ омега-3**	**C20:4n-6/ C22:4n-6**	**C18:0/ C18:1n-9**	**ИБ о-6/о-3**
Контроль – аторвастатин	AUC	0,602	0,548	0,588	0,741	0,835	0,734
	Стандартная ошибка	0,069	0,077	0,073	0,061	0,048	0,063
	95 % ДИ	0,467–0,738	0,396–0,698	0,445–0,731	0,622–0,861	0,740–0,929	0,611–0,857
	p-значение	0,1926	0,5550	0,2620	0,0022	< 0,0001	0,0030
Контроль – розувастатин	AUC	0,638	0,595	0,626	0,669	0,858	0,780
	Стандартная ошибка	0,064	0,072	0,067	0,069	0,046	0,056
	95 % ДИ	0,512–0,764	0,454–0,736	0,495–0,757	0,532–0,805	0,768–0,949	0,671–0,889
	p-значение	0,0728	0,2206	0,1028	0,0262	<0,0001	0,0003
Контроль – без терапии статинами	AUC	0,676	0,701	0,711	0,698	0,831	0,741
	Стандартная ошибка	0,068	0,079	0,066	0,090	0,065	0,087
	95 % ДИ	0,543–0,809	0,546–0,855	0,582-0,840	0,521–0,874	0,704–0,958	0,569–0,912
	p-значение	0,0688	0,0391	0,0296	0,0419	0,0006	0,0134

Во всех трёх сравнениях ДИ не пересекали 0,5 и указывали на сохранение дискриминирующей способности, хотя ширина интервалов в малочисленных подгруппах отражает неопределённость оценки. В совокупности эти результаты демонстрируют обоснованность и перспективность клинического применения соотношения C18:0/C18:1n-9 в качестве дискриминирующего биомаркера после независимой валидации [92].

Среди индексов, связанных с ПНЖК, только отношение АК к АДК (C20:4n-6/C22:4n-6) продемонстрировало хорошую дискриминирующую способность при сравнении группы пациентов, получавших аторвастатин, с контрольной группой (AUC = 0,741 ± 0,061; 95 % ДИ 0,622–0,861; p = 0,002). Омега-3 статус, АК/ЭПК и отношение омега-6/омега-3 характеризовались низкими или умеренными значениями AUC (0,548–0,602) при статистически незначимых p-значениях, что указывает на ограниченную применимость этих показателей в данной подгруппе [92].

При сравнении группы пациентов, получавших розувастатин, с контрольной группой отношение C20:4n-6/C22:4n-6 вновь оказалось наиболее информативным показателем среди ПНЖК-индексов (AUC = 0,669 ± 0,069; 95 % ДИ 0,532–0,805; p = 0,026), обеспечивая удовлетворительную дискриминирующую способность. Остальные индексы (Омега-3 статус, АК/ЭПК и отношение омега-6/омега-3) в подгруппах пациентов с терапией розувастатином сохранялись в диапазоне низкой или удовлетворительной дискриминирующей способности (AUC 0,595–0,638) и статистически значимых различий не достигали (p > 0,05) [92].

При отсутствии терапии статинами показатели АК/ЭПК и отношение омега-6/омега-3 продемонстрировали хорошую дискриминирующую способность и статистическую значимость. Омега-3 статус был близок, но не достиг уровня статистической значимости (AUC = 0,676; p = 0,069), что указывает на возможную, но менее выраженную связь этого показателя с исследуемым патологическим процессом [92].

Дискриминирующая способность трёх наиболее стабильных маркеров (C18:0/C18:1n-9, C20:4n-6/C22:4n-6 и ИБ о-6/о-3) при исключении пациентов с

сахарным диабетом сохранялась во всех подгруппах: значения AUC оставались в диапазоне хорошей дискриминирующей способности, а статистическая значимость подтверждалась во всех сравнениях (Приложение А, таблица А.3). Примечательно, что в подгруппе аторвастатина, характеризовавшейся наибольшей долей пациентов с сахарным диабетом, исключение этих пациентов не снижало значения AUC, что указывает на то, что сопутствующий сахарный диабет не определял дискриминирующую способность исследуемых маркеров.

В целом среди отдельных соотношений, связанных с ПНЖК, отношение C20:4n-6/C22:4n-6 продемонстрировало наиболее стабильную и надежную дискриминирующую способность при сравнении с контролем, обеспечивая статистически значимые значения AUC в каждой группе. Терапия статинами, по-видимому, снижала дискриминирующую способность ряда индексов: если АК/ЭПК и отношение омега-6/омега-3 обладали дискриминирующей способностью в подгруппе без терапии статинами, то при терапии аторвастатином и розувастатином их информативность для разграничения пациентов и контрольной группы была ниже. Полученные результаты позволяют предположить, что воздействие статинов модифицирует липидомные профили, связанные с исследуемым патологическим процессом, и что показатель C20:4n-6/C22:4n-6 может рассматриваться как показатель, сохраняющий дискриминирующую способность при терапии статинами. Показатель сохранял статистически значимую дискриминирующую способность во всех трёх подгруппах, что позволяет рассматривать его как относительно стабильный кандидатный маркер в рамках данной выборки. Вместе с тем значения AUC для большинства показателей подчёркивают необходимость разработки более чувствительных липидных индексов, сохраняющих дискриминирующую способность при терапии статинами [92].

Дискриминирующую способность соотношений, стандартных и нового индексов при межгрупповом сравнении оценивали с использованием Δ Клиффа и непараметрической меры размера эффекта (таблица 3.10) [112].

Таблица 3.10 – Значение Δ Клиффа (95 % ДИ) для всех попарных сравнений групп [92]

Индексы и соотношения	Группа	Контроль	Аторвастатин	Розувастатин	Без статинов
Омега-3 статус	Контроль		0,21 (от −0,07 до 0,48)	0,32 (от 0,06 до 0,56)	0,39 (от 0,12 до 0,64)
	Аторвастатин	0,21 (от −0,07 до 0,48)		0,17 (от −0,22 до 0,52)	0,24 (от −0,19 до 0,68)
	Розувастатин	0,32 (от 0,06 до 0,56)	0,17 (от −0,22 до 0,52)		0,20 (от −0,24 до 0,65)
	Без статинов	0,39 (от 0,12 до 0,64)	0,24 (от −0,19 до 0,68)	0,20 (от −0,24 до 0,65)	
АК/ЭПК	Контроль		−0,09 (от −0,40 до 0,20)	−0,19 (от −0,48 до 0,10)	−0,40 (от −0,69 до – 0,09)
	Аторвастатин	−0,09 (от −0,40 до 0,20)		−0,12 (от −0,49 до 0,27)	−0,36 (от −0,76 до 0,05)
	Розувастатин	−0,19 (от −0,48 до 0,10)	−0,12 (от −0,49 до 0,27)		−0,31 (от −0,70 до 0,10)
	Без статинов	−0,40 (от −0,69 до – 0,09)	−0,36 (от −0,76 до 0,05)	−0,31 (от −0,70 до 0,10)	
Омега-6/омега-3	Контроль		−0,13 (от −0,42 до 0,16)	−0,26 (от −0,52 до 0,02)	−0,43 (от −0,69 до −0,17)
	Аторвастатин	−0,13 (от −0,42 до 0,16)		−0,15 (от −0,51 до 0,22)	−0,32 (от −0,72 до 0,08)
	Розувастатин	−0,26 (от −0,52 до 0,02)	−0,15 (от −0,51 до 0,22)		−0,30 (от −0,68 до 0,13)
	Без статинов	−0,43 (от −0,69 до −0,17)	−0,32 (от −0,72 до 0,08)	−0,30 (от −0,68 до 0,13)	
C20:4n-6/C22:4n-6	Контроль		0,46 (от 0,20 до 0,70)	0,37 (от 0,09 до 0,63)	0,38 (от 0,01 до 0,73)
	Аторвастатин	0,46 (от 0,20 до 0,70)		−0,04 (от −0,40 до 0,34)	0,04 (от −0,42 до 0,51)
	Розувастатин	0,37 (от 0,09 до 0,63)	−0,04 (от −0,40 до 0,34)		0,01 (от −0,43 до 0,47)
	Без статинов	0,38 (от 0,01 до 0,73)	0,04 (от −0,42 до 0,51)	0,01 (от −0,43 до 0,47)	
C18:0/C18:1n-9	Контроль		0,71 (от 0,53 до 0,87)	0,73 (от 0,54 до 0,89)	0,67 (от 0,40 до 0,90)
	Аторвастатин	0,71 (от 0,53 до 0,87)		0,13 (от −0,23 до 0,50)	0,04 (от −0,42 до 0,49)
	Розувастатин	0,73 (от 0,54 до 0,89)	0,13 (от −0,23 до 0,50)		−0,03 (от −0,46 до 0,40)
	Без статинов	0,67 (от 0,40 до 0,90)	0,04 (от −0,42 до 0,49)	−0,03 (от −0,46 до 0,40)	
ИБ о-6/о-3	Контроль		0,44 (от 0,17 до 0,66)	0,56 (от 0,29 до 0,75)	0,48 (от 0,09 до 0,76)
	Аторвастатин	0,44 (от 0,17 до 0,66)		0,14 (от −0,24 до 0,49)	0,10 (от −0,40 до 0,54)
	Розувастатин	0,56 (от 0,29 до 0,75)	0,14 (от −0,24 до 0,49)		0,01 (от −0,46 до 0,49)
	Без статинов	0,48 (от 0,09 до 0,76)	0,10 (от −0,40 до 0,54)	0,01 (от −0,46 до 0,49)	

Примечание: насыщенность цвета отражает величину Δ Клиффа. Зелёная градация соответствует положительным значениям Δ, жёлтая – отрицательным значениям Δ, серый цвет обозначает пустые ячейки.

Результаты расчета Δ Клиффа для сравнения объединённой группы пациентов с атеросклерозом с контрольной группой приведены в таблице 3.11.

Таблица 3.11 – Значение Δ Клиффа (95 % ДИ), рассчитанное для сравнения объединенных групп пациентов с атеросклерозом и контрольных образцов [92]

Параметр	**Значение Δ Клиффа (95 % ДИ)**
C18:0	0,59 (от 0,40 до 0,75)
C18:1n-9	−0,68 (от 0,83 до −0,50)
C20:3n-6	0,22 (от −0,02 до 0,43)
C20:4n-6	0,32 (от 0,08 до 0,55)
C22:4n-6	−0,17 (от −0,39 до 0,07)
ДПК, C22:5n-3	0,22 (от −0,02 до 0,44)
ЭПК, C20:5n-3	0,28 (от 0,05 до 0,49)
ДГК, C22:6n-3	0,23 (от −0,02 до 0,46)
Omega-3 статус	0,29 (от 0,06 до 0,52)
АК/ЭПК	−0,20 (от −0,41 до 0,02)
Омега-6/омега-3	−0,25 (от −0,48 до −0,02)
C20:4n-6/C22:4n-6	0,41 (от 0,19 до 0,61)
C18:0/C18:1n-9	0,72 (от 0,56 до 0,84)
ИБ о-3/о-6	0,49 (от 0,29 до 0,67)

Наиболее выраженное положительно направленное различие по значению Δ Клиффа при сравнении контрольной группы с группами пациентов устойчиво наблюдалось для отношения C18:0/C18:1n-9. Наибольшее значение Δ Клиффа было получено при сравнении контрольной группы с группой пациентов, получавших аторвастатин: 0,71 (от 0,53 до 0,87) для C18:0/C18:1n-9. Показатели «Омега-3 статус» и C20:4n-6/C22:4n-6 демонстрировали умеренную, но воспроизводимую положительную связь между контрольной группой и группами пациентов [92].

Следует отметить, что значения Δ Клиффа для Омега-3 статуса, АК/ЭПК и омега-6/омега-3 при сравнении пациентов с контрольной группой имели следующую закономерность: наиболее выраженное различие наблюдалось между контрольной группой и группой пациентов без терапии статинами, следом идет группа с терапией розувастатином, а наименьшие значения Δ Клиффа были при сравнении группы аторвастатина с контрольной группой [92].

Интересно, что выявлены также выраженные отрицательные различия между группами пациентов при сравнении группы без терапии статинами с группами аторвастатина и розувастатина по отношению омега-6/омега-3 и АК/ЭПК (в диапазоне от – 0,36 до – 0,30). В то же время для остальных попарных сравнений по АК/ЭПК и омега-6/омега-3 внутри группы пациентов наблюдались лишь небольшие или умеренные эффекты. Значения Δ Клиффа находились в диапазоне от минус 0,26 до минус 0,09, а ДИ часто включали ноль [92].

Результаты анализа можно суммировать следующим образом: наибольшее значения Δ Клиффа наблюдались у соотношения C18:0/C18:1n-9, далее идет C20:4n-6/C22:4n-6, потом традиционные индексы. При сравнении внутри групп пациентов для АК/ЭПК и отношения омега-6/омега-3 выявлены наибольшие значения Δ Клиффа, а для прочих показателей различия между типом фармакотерапии в целом были незначительными [92].

3.5. Разработка и оценка информативности индекса баланса омега-6/омега-3 и комбинированной логит-модели на основе профиля жирных кислот

Выбор АК, АДК, ЭПК, ДПК и ДГК для построения составного индекса обусловлен их участием в метаболических путях, связанных с регуляцией воспаления. АК, ЭПК, ДПК и ДГК служат предшественниками липидных медиаторов, участвующих в развитии и разрешении воспалительной реакции, баланс которых имеет значение в патогенезе атеросклероза [45, 89]. Для АДК также описаны противовоспалительные эффекты в экспериментальных исследованиях [64]. Вместе с тем плазменные уровни ЭПК подвержены кратковременным изменениям после её поступления в организм [242]. Для учёта этой особенности и многостадийных превращений в путях омега-6 и омега-3 была выполнена комбинированная оценка содержания выбранных ЖК. Объединённая формула с включением всех трёх омега-3 ЖК (ЭПК, ДПК и ДГК) обеспечивала сбалансированное представление метаболизма длинноцепочечных омега-3 ПНЖК и снижала влияние отдельных выбросов. Итоговый индекс, объединяющий

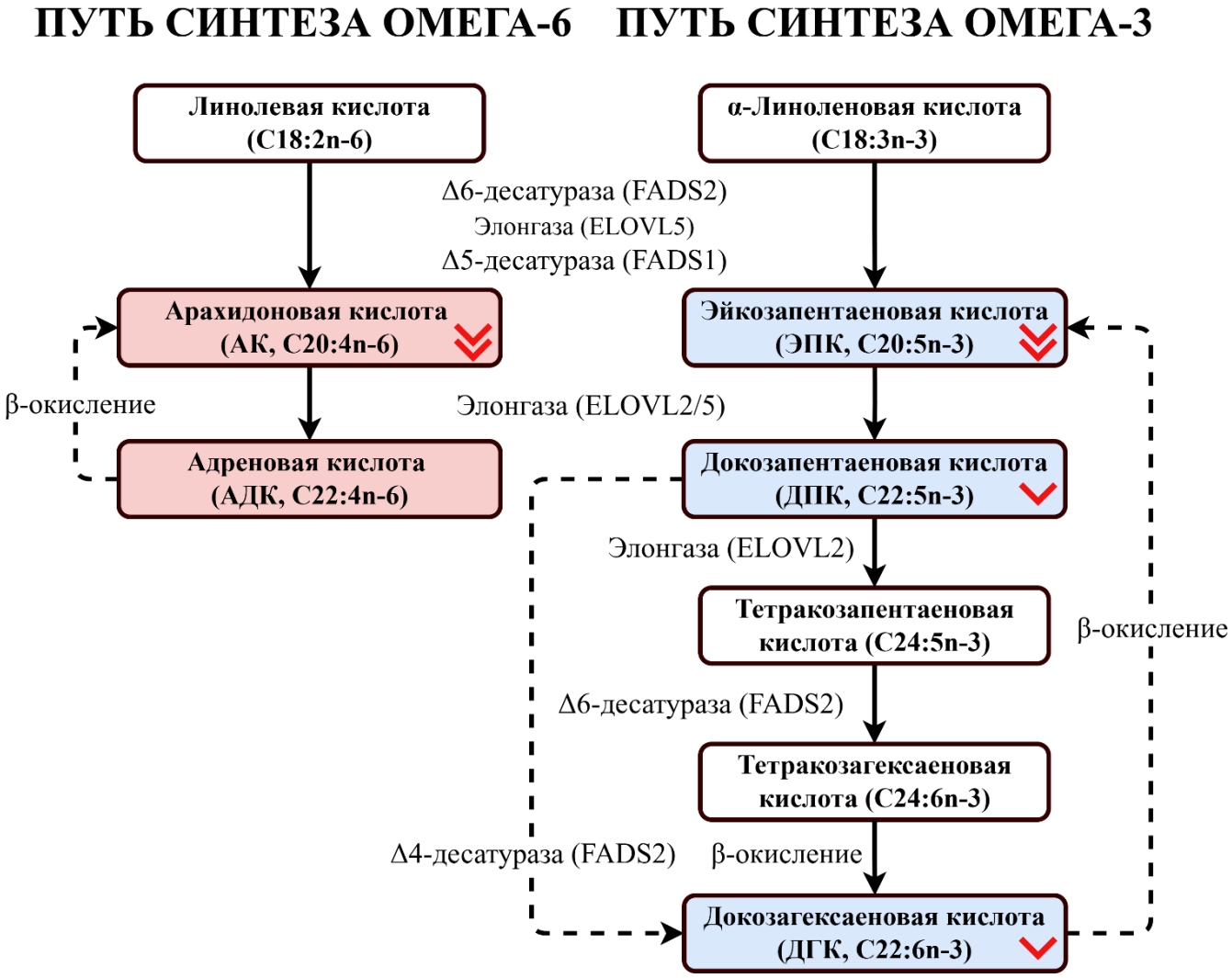
соотношения C20:4n-6/C22:4n-6, ЭПК/ДГК и ДПК/ДГК, которые в совокупности являются косвенными показателями активности элонгаз (ELOVL2 и ELOVL5) и десатураз (FADS1/2), продемонстрировал наилучшие диагностические характеристики среди исследованных ПНЖК-индексов [92].

Составной маркер получил название ИБ о-6/о-3, поскольку он объединяет несколько промежуточных продуктов метаболизма омега-3 и омега-6 ЖК, отражающих преобразования, зависящие от десатуразы и элонгазы, а не статические концентрации ЖК. Это название подчеркивает биохимическую специфичность индекса, отличая его от более простых показателей, таких как концентрация ЭПК+ДГК в плазме (омега-3 статус) или омега-3 индекс, определяемый в эритроцитах [92].

Новый индекс рассчитывали на основе процентного (молярного) содержания отдельных ЖК. Формула объединяет отношения этих величин, поэтому итоговый индекс является безразмерным (формула 1) [92]:

$$\text{ИБ о-6/о-3} = \frac{\text{АК} \times \sqrt{\text{ЭПК} \times \text{ДПК}}}{\text{АДК} \times \text{ДГК}} \quad (1)$$

ИБ о-6/о-3 был разработан таким образом, чтобы отражать ключевые этапы метаболизма длинноцепочечных ПНЖК (с числом атомов углерода ≥ C20), которые служат предшественниками СПМ и участвуют в разрешении воспаления [254]. На первом этапе были проанализированы C20:3n-6, АК, АДК, ЭПК, ДПК и ДГК и оценены соотношения, соответствующие ключевым ферментативным превращениям. В окончательный индекс включали только компоненты, которые сохраняли статистическую информативность в нашей когорте (АК, АДК, ЭПК, ДПК и ДГК). В результате была сформирована структура индекса, объединяющая отношение удлинения омега-6 C20:4n-6/C22:4n-6 с показателями метаболизма омега-3 в сторону ДГК, что позволяет комплексно охарактеризовать соотношения метаболитов путей омега-6 и омега-3 в рамках одной интегральной величины (рисунок 3.17) [92].



Примечание: сплошные линии представляют канонические реакции пути Шпрехера, включая этапы десатурации (Δ5-, Δ6-), элонгации и пероксисомного β-окисления, приводящие к образованию АК, АДК, ЭПК, ДПК и ДГК. Пунктирные линии указывают на путь Δ4-десатуразы, который в настоящее время исследуется как потенциальный альтернативный путь для прямой конверсии ДПК→ДГК, а также этапы ретроконверсии (АДК→АК и ДГК→ЭПК) посредством пероксисомного β-окисления. Промежуточные продукты между исходными предшественниками омега-6 (линолевая кислота) и омега-3 (α-линоленовая кислота) и ключевыми длинноцепочечными метаболитами (АК и ЭПК) не показаны, поскольку изображены только соединения, имеющие отношение к данному исследованию. Омега-6 ЖК, включенные в ИБ о-6/о-3 (АК и АДК), показаны красным цветом, а омега-3 ЖК (ЭПК, ДПК и ДГК) – синим. Двойная красная стрелка обозначает статистически значимое снижение уровня соответствующей жирной кислоты в двух подгруппах атеросклероза по сравнению с контрольной группой, одиночная стрелка – снижение в одной подгруппе атеросклероза. При этом для всех ЖК, отмеченных стрелками, наблюдалась тенденция к снижению (см. таблицу 3.8). Эти взаимосвязанные реакции представляют собой биохимическую основу ИБ о-6/о-3, который объединяет АК, АДК, ЭПК, ДПК и ДГК и отражает многоэтапные ферментативные превращения длинноцепочечных ЖК [37, 189, 245, 287]

Рисунок 3.17 – Схематическое представление путей синтеза длинноцепочечных ПНЖК омега-6 (слева) и омега-3 (справа) в контексте разработки ИБ о-6/о-3 [92]

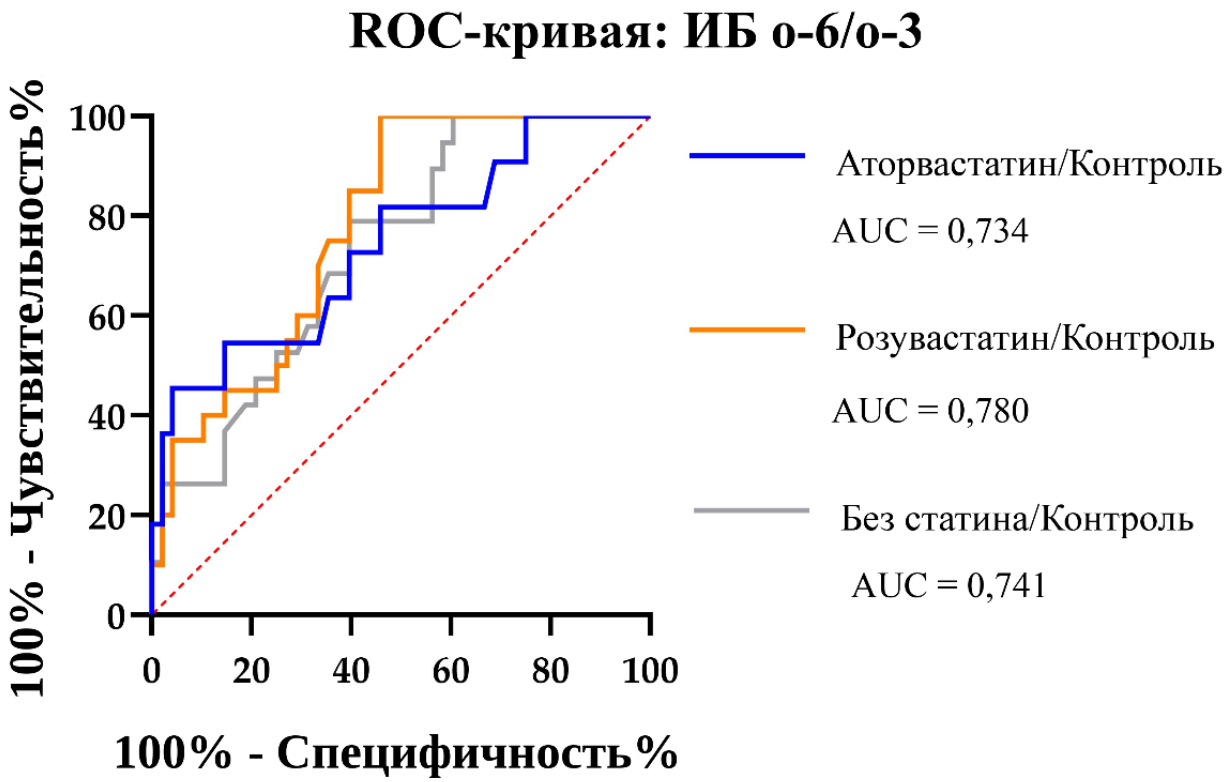
Для омега-3 ПНЖК рассчитывали геометрическое среднее ЭПК и ДПК (√(ЭПК×ДПК)) и делили его на ДГК. Такой подход повышает устойчивость показателя при анализе плазмы крови за счёт снижения чувствительности к кратковременным колебаниям уровней ЭПК [242], сохраняя при этом информацию о метаболическом пути путем включения преобразования ЭПК в ДПК в единый метаболический показатель, связанный с ДГК.

Расчет значений нового показателя ИБ о-6/о-3 был выполнен для всех четырёх групп, после чего результаты были сопоставлены с контрольной группой (Таблица 3.8).

В контрольной группе отмечались наибольшие значения индекса, отражающие наиболее высокую конверсию ПНЖК: среднее значение составило 12,00 ± 4,94. Во всех трёх группах пациентов с атеросклерозом выявлено статистически значимое снижение ИБ о-6/о-3. Среднее снижение составляло 30–34 % в сравнении с контрольной группой, что свидетельствует о выраженном нарушении взаимопревращений длинноцепочечных ПНЖК при заболевании [92].

Для характеристики выраженности выявленных различий анализ статистической значимости дополняли оценкой размера эффекта, позволяющей судить о степени разделения распределений значений индекса в сравниваемых группах. Оценка по Δ Клиффа подтвердила выраженные положительные сдвиги для данного показателя, которые варьировали от 0,44 (средний эффект) при сравнении контрольной группы с группой аторвастатина до 0,56 (крупный эффект) при сравнении контрольной группы с группой розувастатина (таблица 3.10). В то же время различия между группами лечения в целом были небольшими; однако при сравнении групп аторвастатина и розувастатина получено пограничное значение $\Delta = 0{,}14$, которое может оказаться значимым в последующих исследованиях, направленных на более детальную оценку влияния терапии статинами на состав ЖК крови [92].

Далее были построены ROC-кривые для нового ИБ о-6/о-3 отдельно в каждой подгруппе терапии статинами (Таблица 3.9), чтобы оценить, насколько хорошо индивидуальные значения показателя позволяют различать пациентов с атеросклерозом и лиц контрольной группы (рисунок 3.18).



Примечание: красная пунктирная линия – референтная линия случайного классификатора (AUC = 0,5), отражающая полное отсутствие диагностической ценности модели, когда чувствительность равна 1 – специфичность

Рисунок 3.18 – ROC-кривые для индекса ИБ о-6/о-3 в каждой подгруппе терапии статинами [92]

ИБ о-6/о-3 сохранял статистически значимую дискриминирующую способность при сравнении каждой из трёх подгрупп пациентов (получавших розувастатин, аторвастатин или не получавших статины) с контрольной группой. Этот результат позволяет рассматривать индекс как перспективный показатель для исследования профиля ЖК при терапии статинами и обосновывает необходимость дальнейшей проверки в более крупных проспективных когортных исследованиях. Для характеристики классификации при конкретном пороге дополнительно оценивали чувствительность и специфичность – доли правильно классифицированных пациентов с атеросклерозом и лиц контрольной группы соответственно.Оптимальное пороговое значение определяли с помощью критерия Юдена (путем максимизации *J*-статистики / индекса Юдена) (таблица 3.12) [100, 241, 295].

Таблица 3.12 – Результаты ROC-анализа и характеристики классификации по ИБ о-6/о-3 при пороговых значениях, выбранных по критерию Юдена [92]

Сравнение	AUC	Пороговое значение*	Чувствительность	Специфичность	Точность
Контрольная группа – аторвастатин	0,734	12,5	1,000	0,396	0,561
Контрольная группа – розувастатин	0,780	10,8	1,000	0,542	0,676
Контрольная группа – без терапии статинами	0,741	6,21	0,455	0,958	0,864
Контрольная группа – атеросклероз	0,749	10,8	0,878	0,542	0,711
Примечание: * пороговое значение выбрано как середина плато пороговых значений (правило «середины плато»), при которых индекс Юдена (чувствительность + специфичность − 1) достигает максимума. Для каждого сравнения применяли правило: «классифицировать как атеросклероз при значении индекса ≤ порогового значения». При значении ниже порогового значения наблюдение относили к группе «Атеросклероз».					

ИБ о-6/о-3 сохранял информативность для выявления метаболических сдвигов у пациентов при терапии статинами. При выбранных пороговых значениях точность классификации в подгруппах аторвастатина и розувастатина была ниже, чем в подгруппе без терапии статинами, при более высокой чувствительности и меньшей специфичности. При наличии нескольких пороговых значений, обеспечивающих одинаковое (максимальное) значение индекса Юдена (т.е. «плато» оптимальных пороговых значений), в качестве точки отсечения выбирали середину этого диапазона (среднее или медиану). Такой подход оправдан при отсутствии явного предпочтения между минимизацией ложноположительных и ложноотрицательных результатов и задаёт воспроизводимое правило, устойчивое к небольшим численным колебаниям, при сохранении критерия максимизации суммы чувствительности и специфичности (таблица 3.12) [92]. Параметры ROC-анализа для других ЖК и стандартных индексов приведены в таблице 3.13. Дополнительная информация о характеристиках пороговых значений ИБ о-6/о-3 представлена в таблице 3.14.

Таблица 3.13 – Параметры ROC-кривых для отдельных биомаркеров в плазме трех исследуемых групп с атеросклерозом в сравнении с контрольной группой [92]

Показатель	Контроль – аторвастатин				Контроль – розувастатин				Контроль – без терапии статинами			
	AUC	Станд. ошибка	95 % ДИ	P-значение	AUC	Станд. ошибка	95 % ДИ	P-значение	AUC	Станд. ошибка	95 % ДИ	P-значение
Выбранные ЖК: пути НЖК, МНЖК, омега-6, омега-3												
C18:0	0,785	0,054	0,678–0,891	0,0003	0,793	0,053	0,689–0,898	< 0,0001	0,819	0,064	0,693–0,945	0,0010
C18:1n-9	0,827	0,051	0,728–0,927	< 0,0001	0,863	0,046	0,773–0,953	< 0,0001	0,856	0,054	0,751–0,962	0,0002
C20:3n-6	0,609	0,084	0,444–0,773	0,1685	0,640	0,073	0,498–0,782	0,0659	0,587	0,101	0,389–0,785	0,3706
C20:4n-6	0,671	0,067	0,538–0,802	0,0295	0,711	0,068	0,577–0,844	0,0054	0,637	0,089	0,462–0,812	0,1567
C22:4n-6	0,576	0,076	0,428–0,725	0,3301	0,503	0,069	0,368–0,639	0,9648	0,601	0,079	0,447–0,755	0,2978
ДПК, C22:5n-3	0,512	0,080	0,354–0,669	0,8825	0,615	0,067	0,483–0,747	0,1274	0,671	0,076	0,522–0,819	0,0778
ЭПК, C20:5n-3	0,591	0,076	0,442–0,740	0,2517	0,628	0,072	0,487–0,768	0,1021	0,682	0,085	0,518–0,846	0,0634
ДГК, C22:6n-3	0,573	0,069	0,436–0,710	0,3505	0,612	0,065	0,484–0,739	0,1472	0,647	0,069	0,513–0,782	0,1286

Таблица 3.14 – Дополнительные показатели качества классификации ИБ о-6/о-3 и логит-модели при выбранных пороговых значениях [92]

Показатель	**Сравнение**	**Коэффициент каппа Коэна**	**Матрица ошибок**	**ПЦПР**	**ПЦОР**	***p* (Acc > NIR)**	**Критерий Мак-Немара**
ИБ о-6/о-3	Контроль – аторвастатин	0,263	ИО = 19 ЛП = 29 ЛО = 0 ИП = 18	0,383	1,000	0,999	2,00e-07
	Контроль – розувастатин	0,410	ИО = 26 ЛП = 22 ЛО = 0 ИП = 20	0,476	1,000	0,750	7,56e-06
	Контроль – без терапии статинами	0,480	ИО = 46 ЛП = 2 ЛО = 6 ИП = 5	0,714	0,885	0,205	0,289
	Контроль – атеросклероз	0,421	ИО = 26 ЛП = 22 ЛО = 6 ИП = 43	0,662	0,812	2,92e-05	0,005
Логит-модель	Контроль – атеросклероз	0,570	ИО = 35 ЛП = 13 ЛО = 8 ИП = 42	0,764	0,814	1,70e-08	3,83e-01

Примечание: ИП – истинно положительный результат; ИО – истинно отрицательный результат; ЛП – ложноположительный результат; ЛО – ложноотрицательный результат; ПЦПР – прогностическая ценность положительного результата; ПЦОР – прогностическая ценность отрицательного результата; Acc – общая точность классификации; NIR – доля наблюдений наиболее представленного класса (No Information Rate). Для ИБ о-6/о-3 использованы пороговые значения, представленные в таблице 3.12; для логит-модели использовано пороговое значение 0,02 по шкале логит-скора. Положительным исходом считали наличие атеросклероза. Значение *p* относится к односторонней проверке гипотезы о превышении точностью классификации уровня NIR.

Характеристики классификации ИБ о-6/о-3 зависели от состава сравниваемой подгруппы. На фоне терапии статинами выбранные пороги обеспечивали преимущественно высокую чувствительность при ограниченной специфичности, тогда как в подгруппе без терапии статинами наблюдалось обратное соотношение чувствительности и специфичности. С учётом ограниченного объёма отдельных подгрупп данные различия требуют подтверждения в независимых выборках [92].

Объединенная группа с атеросклерозом имела схожие значения чувствительности и точности, как и группа, получающая терапию розувастатином. Таким образом, в обеих подгруппах, получавших статины (аторвастатин и розувастатин), индекс функционировал в основном как высокочувствительный, но

не очень специфичный маркер. В целом результаты показали, что пороговые значения в группах терапии статинами были выше и располагались ближе к медианному значению контрольной группы, вследствие чего диагностическая точность снижалась. Выявленные закономерности позволяют рассматривать ИБ о-6/о-3 как дополнительный показатель метаболических сдвигов при терапии статинами с учётом ограничений его самостоятельного применения для классификации исследованных групп [92].

Пороговые значения для наиболее многочисленной пары сравниваемых групп (контрольная группа – объединённая группа пациентов с атеросклерозом) дополнительно оценивали в рамках кросс-валидации. Однако показатели качества, полученные при кросс-валидации, оказались недостаточно высокими; поэтому была построена логит-модель и рассчитан интегральный показатель (логит-скор) для межгруппового сравнения (таблица 3.15).

Таблица 3.15 – Характеристики классификации по результатам кросс-валидации и устойчивость порогового значения по критерию Юдена для логит-модели и индекса ИБ о-6/о-3 при сравнении двух групп (контрольная группа – атеросклероз) [92]

Показатели	**ИБ о-6/о-3**	**Логит-модель**
AUC	0,246 (от 0,161 до 0,353)	0,880 (0,811 до 0,941)
Чувствительность	0,976 (0,927 до 1,000)	0,894 (0,805 до 0,962)
Специфичность	0,0 (0,000 до 0,000)	0,717 (0,588 до 0,837)
Точность	0,493 (0,398 до 0,596)	0,806 (0,728 до 0,880)
Сбалансированная точность	0,488 (0,463 до 0,500)	0,805 (0,727 до 0,876)
Коэффициент корреляции Мэтьюса (MCC)	−0,111 (от – 0,197 до – 0,041)	0,621 (0,470 до 0,763)
LR +	0,976 (0,927 до 1,000)	3,155 (2,140 до 5,551)
LR –	∞	0,148 (0,049 до 0,277)
Прогностическая ценность положительного результата	0,499 (0,402, 0,608)	0,763 (0,646 до 0,864)
Прогностическая ценность отрицательного результата	0,0 (0,000, 0,000)	0,869 (0,750 до 0,951)
Медиана порога	3,94	0,02
Минимальный порог	3,94	−0,146
Максимальный порог	4,84	0,124
Стандартное отклонение порога	0,161	0,036

Примечание: значения представлены как оценка показателя и 95 % ДИ.
LR+ : отношение правдоподобия положительного результата (Likelihood ratio for positive results), определяется как чувствительность / (1 – специфичность); LR –: отношение правдоподобия отрицательного результата (Likelihood ratio for negative results), определяется как (1– чувствительность) / специфичность.

При интерпретации результатов кросс-валидации следует учитывать направление ROC-кривой для ИБ о-6/о-3. Поскольку снижение значения ИБ о-6/о-3 ассоциировано с наличием атеросклероза, AUC = 0,246 отражает обратную ориентацию ранжирования классов и эквивалентно AUC = 0,754 при инверсии направления ROC-кривой. AUC характеризует общую способность показателя ранжировать наблюдения, однако не гарантирует устойчивости классификации при использовании конкретного порогового значения. Вместе с тем совокупность показателей кросс-валидации свидетельствовала о недостаточной устойчивости пороговой классификации ИБ о-6/о-3 как самостоятельного диагностического показателя, что послужило основанием для разработки комбинированной логит-модели [92].

Для улучшения качества межгрупповой классификации при кросс-валидации и комплексной характеристики метаболических сдвигов, сохраняющихся у пациентов с атеросклерозом при терапии статинами, была разработана логистическая регрессионная модель. В качестве потенциального предиктора рассматривали расчетный показатель ИБ о-6/о-3 совместно с пятью другими показателями профиля ЖК (Омега-3 статус, отношение омега-6/омега-3, АК/ЭПК, C20:4n-6/C22:4n-6 и C18:0/C18:1n-9). Для выбора оптимального уровня сложности модели оценивали её применимость по критериям Райли и выполняли регуляризованный отбор признаков методом LASSO. На основе отобранных переменных рассчитывали интегральный логит-скор, представляющий собой значение линейного предиктора модели logit (*p*) (таблица 3.16) [92].

Таблица 3.16 – Оценка надёжности (по критериям Райли) различий между группами пациентов с атеросклерозом, стратифицированных по терапии статинами, а также объединёнными группами, для построения модели с отбором переменных методом LASSO [92]

Сравнение	**Показатель**	**n**	**Число случаев**	**Распростра-ненность**	**Показатель усадки S†**	**R^2 Нагелкерке**	**n_{req} (Δ = 0,10)**	**Соответствует всем критериям Райли**
Контрольная группа – аторвастатин	Омега-3 статус	69	19	0,28	0,67	0,04	78	Нет
	АК/ЭПК	69	19	0,28	0,37	0,01	78	Нет
	Омега-6/омега-3	69	19	0,28	0	0	78	Нет
	C18:0/C18:1n-9	69	19	0,28	0,96	0,43	78	Нет
	C20:4n-6/C22:4n-6	69	19	0,28	0,91	0,2	78	Нет
	ИБ о-6/о-3	69	19	0,28	0,92	0,23	78	Нет
Контрольная группа – розувастатин	Омега-3 статус	71	21	0,29	0,83	0,10	80	Нет
	АК/ЭПК	71	21	0,29	0,56	0,03	80	Нет
	Омега-6/омега-3	71	21	0,29	0,05	0,01	80	Нет
	C18:0/C18:1n-9	71	21	0,29	0,96	0,46	80	Нет
	C20:4n-6/C22:4n-6	71	21	0,29	0,89	0,16	80	Нет
	ИБ о-6/о-3	71	21	0,29	0,94	0,31	80	Нет
Контрольная группа – без терапии статинами	Омега-3 статус	62	12	0,19	0,83	0,13	58	Нет
	АК/ЭПК	62	12	0,19	0,80	0,11	58	Нет
	Омега-6/омега-3	62	12	0,19	0,34	0,01	58	Нет
	C18:0/C18:1n-9	62	12	0,19	0,94	0,37	58	Да
	C20:4n-6/C22:4n-6	62	12	0,19	0,81	0,11	58	Нет
	ИБ о-6/о-3	62	12	0,19	0,89	0,2	58	Нет

Продолжение Таблицы 3.16

Контрольная группа – атеросклероз (объединённая группа)	Омега-3 статус	102	52	0,51	0,89	0,11	96	Нет
	АК/ЭПК	102	52	0,51	0,76	0,04	96	Нет
	Омега-6/омега-3	102	52	0,51	0,17	0,01	96	Нет
	C18:0/C18:1n-9	102	52	0,51	0,98	0,48	96	Да
	C20:4n-6/C22:4n-6	102	52	0,51	0,94	0,21	96	Да
	ИБ о-6/о-3	102	52	0,51	0,96	0,30	96	Да

Примечание: как следует из последнего столбца, в целом сравнения при стратификации по терапии статинами (контрольная группа по сравнению с группами аторвастатина/розувастатина/без терапии статинами) обладают недостаточной статистической мощностью (отмечены как «Нет») для устойчивой разработки многомерной модели в соответствии с критериями Райли (то есть требуемый объём выборки превышает имеющийся n, а ожидаемая усадка недостаточна). Напротив, сравнение объединённых групп (контрольная группа по сравнению с объединённой группой атеросклероза) для половины показателей соответствует критериям применимости, что поддерживает разработку единой модели на данных пациентов, получавших и не получавших терапию статинами.

Показатель усадки S† – коэффициент, отражающий ожидаемую степень переобучения/необходимости регуляризации по критериям Райли.

n_{req} – минимально необходимый объём выборки при величине допустимой погрешности $\Delta = 0{,}10$.

Критерии Райли использовали для подтверждения достаточности объёма выборки и доли событий для построения предлагаемой многомерной логистической модели, а также для ограничения сложности модели и снижения риска переобучения до выполнения отбора переменных методом LASSO. Поскольку подгруппы атеросклероза по терапии статинами (аторвастатин, розувастатин и отсутствие терапии статинами) были слишком малочисленными для устойчивого построения многомерной модели отдельно для каждой подгруппы, для пилотной разработки модели использовали объединённую когорту пациентов с атеросклерозом [92].

В итоговую модель вошли показатели, сохранявшие дискриминирующую способность при сравнении каждой подгруппы пациентов с контрольной группой (таблицы 3.8–3.12). Такой выбор компонентов обосновывает дальнейшее изучение применимости модели для оценки профиля ЖК при различных режимах терапии статинами.

Для разработки пилотной модели использовали объединённый набор данных и рассматривали только наиболее крупные группы: всех пациентов с атеросклерозом (n = 52), получавших и не получавших терапию статинами, объединили в одну группу и сопоставили с контрольной группой (n = 50) (формула 2 и Таблица 3.17) [92].

$$logit\,(p) = 5{,}254 - 0{,}145 \times \text{ИБ о-6/о-3} - 11{,}544 \times (\text{C18:0/C18:1n-9}), \qquad (2)$$

$$\text{где } p = {}^{1}/_{(1 + e^{-logit\,(p)})}$$

В формуле 2 p – это расчётная вероятность принадлежности к группе “Атеросклероз” в построенной модели (от 0 до 1); logit(p) – линейный предиктор модели (логит-скор), равный ln[p/(1 − p)]; e – основание натурального логарифма; ИБ о-6/о-3 – индекс баланса омега-6/омега-3, рассчитываемый по формуле 1; C18:0/C18:1n-9 – отношение содержания стеариновой кислоты (C18:0) к содержанию олеиновой кислоты (C18:1n-9) в плазме крови.

Таблица 3.17 – Оценённые параметры искомой функции, полученные методом LASSO [92]

Предиктор	β (стандартизованный)	B (нестандартизованный)
Свободный член	−0,147	5,254
ИБ о-6/о-3	−0,622	−0,145
C18:0/C18:1n-9	−1,416	−11,544
C20:4n-6/C22:4n-6	0,000	0,000

В итоговой многофакторной модели логистической регрессии статистически значимую независимую ассоциацию с исходом сохранило лишь ограниченное число предикторов. Соотношение C20:4n-6/C22:4n-6 не вносило значимого вклада в модель (B ≈ 0; β = 0,000) и после корректировки на другие ковариаты не обладало самостоятельной прогностической ценностью. Напротив, ИБ о-6/о-3 имел отрицательный стандартизованный коэффициент регрессии (β = −0,622; нестандартизованный коэффициент B = −0,145), что указывает: более высокие значения индекса ассоциированы с меньшей вероятностью предполагаемого исхода [92]. Наиболее выраженным предиктором оказалось отношение C18:0/C18:1n-9, продемонстрировавшее наиболее сильную отрицательную связь (стандартизованный β = −1,416; в исходной шкале B = −11,544), что указывает на существенную обратную зависимость с зависимой переменной. В целом полученные результаты показывают, что диагностическая эффективность модели в основном определяется ИБ о-6/о-3 и отношением C18:0/C18:1n-9, тогда как остальные изученные показатели значимого вклада не вносили [92]. таблице 3.18.

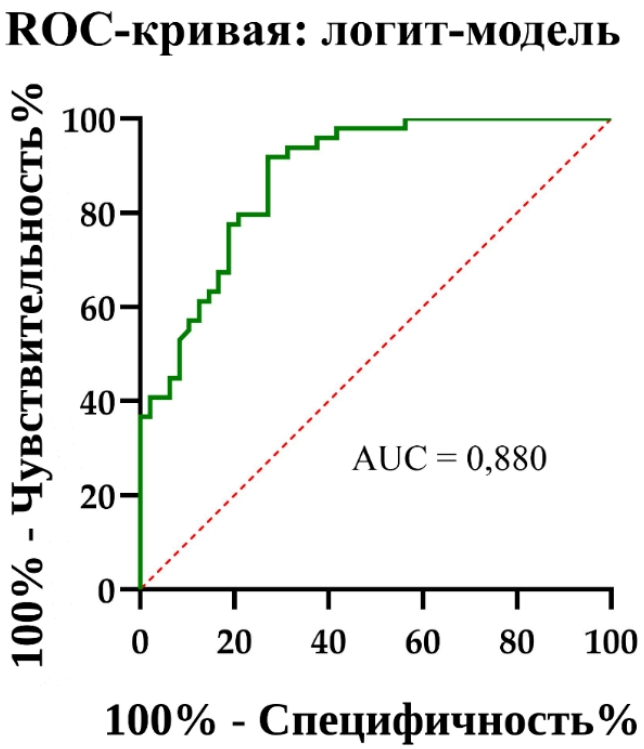
Сводные показатели качества логистической модели, включая метрики дискриминирующей способности (AUC), точности классификации, доли объяснённой вариации (псевдо-R^2) и калибровки, представлены в таблице 3.18.

Таблица 3.18 – Параметры логистической регрессионной модели, оптимизированной методом LASSO [92]

Атеросклероз, M ± SD	Контроль, M ± SD	AUC	Оценка Бриера	R^2 Кокса–Снелла	R^2 Нагелкерке	Наклон калибровочной кривой
0,959 ± 0,849 *	−1,28 ± 1,65	0,880	0,137	0,423	0,564	1,122
Примечание: $p < 0,0001$; результаты t-критерия Уэлча. Данные представлены как M ± SD. M – среднее. SD – стандартное отклонение						

Показатели качества модели свидетельствовали о высокой дискриминирующей способности и удовлетворительной калибровке. Значение AUC составило 0,880, что отражает высокую способность модели различать группы по исходу. Оценка Бриера 0,137 указывает на приемлемую точность вероятностных прогнозов. Хорошее качество подгонки модели дополнительно подтверждалось значениями псевдокоэффициентов детерминации: R^2 Кокса–Снелла = 0,423 (высокое качество аппроксимации данных) и R^2 Нагелкерке = 0,564 (модель объясняет 56,4 % общей дисперсии). Наклон калибровочной кривой был близок к 1 (1,122), подтверждая адекватность калибровки разработанной модели [92].

ROC-анализ (ROC-кривая), оценка размера эффекта по Δ Клиффа и оптимальная точка отсечения для логит-скора свидетельствовали о высокой различающей (дискриминирующей) способности модели (рисунок 3.19, таблица 3.19).



Примечание: все пациенты с атеросклерозом объединены (включая подгруппы аторвастатина, розувастатина и без терапии статинами). Красная пунктирная линия – референтная линия случайного классификатора (AUC = 0,5), отражающая полное отсутствие разделительной способности модели, при котором чувствительность равна 1 – специфичность

Рисунок 3.19 – ROC-кривые для логит-модели при сравнении двух групп – контрольной группы и группы атеросклероза [92]

Таблица 3.19 – Результаты ROC-анализа и характеристики классификации для логит-модели при пороговом значении, выбранном по критерию Юдена (правило середины «плато»), а также значения Δ Клиффа [92]

Δ Клиффа (95 % ДИ)	**AUC (95 % ДИ)**	**Станд. ошибка**	***p*-значение**	**Пороговое значение**	**Чувствительность**	**Специфичность**	**Точность**
−0,76 (от −0,89 до −0,62)	0,880 (от 0,811 до 0,941)	0,033	< 0,0001	0,02	0,840	0,729	0,786

Примечание: сравнение выполнено между объединённой группой пациентов с атеросклерозом и контрольной группой. Порог выбран как середина диапазона значений, при которых индекс Юдена (чувствительность + специфичность − 1) достигает максимума. При значении логит-скора ≥ 0,020 результат модели относили к классу «атеросклероз». Δ Клиффа рассчитана в направлении «контрольная группа – атеросклероз».

Разделительная способность разработанной модели существенно превышала референтный уровень случайного классификатора (линию случайного угадывания с AUC = 0,5) на ROC-графике и превосходила показатели ранее использованных биомаркеров. Это указывает на высокий потенциал модели в дифференциации сравниваемых групп [92].

При внутренней валидации с применением стратифицированной 10-кратной кросс-валидации в сочетании с 1000 бутстреп-выборками логит-модель продемонстрировала устойчивую разделительную способность. Кросс-валидированная точность составила 0,806 (95 % ДИ: 0,728–0,880), чувствительность – 0,894 (95 % ДИ: 0,805–0,962), специфичность – 0,717 (95 % ДИ: 0,588–0,837) (таблица 3.15).

Модель продемонстрировала площадь под ROC-кривой (AUC) 0,880 (95 % ДИ: 0,811–0,941). При применении итогового порогового значения логит-скора ≥ 0,02, выбранного по индексу Юдена (*J*) и соответствующего прогнозируемой вероятности p = 0,505, точность классификации в анализируемой выборке составила 78,6 %, чувствительность – 84,0 %, специфичность – 72,9 %. Коэффициент корреляции Мэтьюса (Matthews correlation coefficient, MCC) составил 0,62, а коэффициент каппа Коэна κ – 0,57, что свидетельствовало о достаточно высоком качестве классификации и умеренном согласии между предсказанными и фактическими результатами. Значение 78,6 % характеризует

точность классификации при фиксированном пороге в анализируемой выборке, тогда как кросс-валидированная оценка точности составила 80,6 % (95 % ДИ: 72,8–88,0 %) (таблицы 3.14, 3.15 и 3.19) [92].

Матрица ошибок (ИО = 35, ЛП = 13, ЛО = 8, ИП = 42) подтвердила сбалансированное распределение ошибок классификации без признаков систематического смещения (критерий МакНемара: p = 3,83e−01). Точность классификации была статистически значимо выше, чем у безинформативного (наивного) классификатора, всегда выбирающего наиболее частый класс (no-information rate, NIR) (p < 0,0001), что подтверждает неслучайный характер прогностической эффективности модели (таблица 3.15) [92].

В целом, при использовании только индекса ИБ о-6/о-3 были выявлены статистически значимые различия между группами пациентов, однако его диагностическая эффективность с учётом результатов кросс-валидации оказалась недостаточно высокой. В то же время логит-модель продемонстрировала более высокую устойчивость и чувствительность при включении дополнительного показателя C18:0/C18:1n-9 [92].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методологическое значение разработанной аналитической методики и её преимущества перед существующими подходами для оценки метаболизма ЖК. Полученные в настоящей работе результаты разработки и валидации оригинальной аналитической методики количественного определения ЖК в фракциях крови методом ВЭЖХ-МС/МС с использованием аммонийных аддуктов метиловых эфиров ЖК (раздел 3.1) требуют отдельного обсуждения в контексте существующих методологических подходов к оценке метаболизма ЖК. В настоящем разделе аналитические характеристики, продемонстрированные разработанной методикой, рассматриваются в сопоставлении с возможностями газохроматографических методов и альтернативных вариантов на основе жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием, доминирующих в современной литературе [41, 90, 121, 268]. Особое внимание уделено тем аспектам, которые имеют принципиальное значение именно для задач клинической фармакологии: одновременному количественному определению субстратов и продуктов ключевых ферментативных реакций, разделению *цис*- и *транс*-изомеров, чувствительности к минорным компонентам профиля ЖК, а также соответствию валидационных характеристик метода требованиям, предъявляемым к биоаналитическим исследованиям лекарственных средств [94].

Газохроматографические методы, такие как ГХ с пламенно-ионизационным детектированием и ГХ-МС, на протяжении нескольких десятилетий остаются основным аналитическим инструментом для профилирования ЖК в биологических образцах, включая стандартные процедуры расчета омега-3 индекса в мембранах эритроцитов [41, 90, 121, 268]. Их широкое распространение обусловлено короткой продолжительностью одного аналитического цикла, хорошей формой хроматографических пиков и высокой коммерческой доступностью стандартных образцов МЭЖК [90]. Вместе с тем, как показывает критический анализ литературы, для задач оценки метаболизма ЖК данный подход обнаруживает ряд принципиальных ограничений. Полученные нами результаты разработки

альтернативного ВЭЖХ-МС/МС подхода [93] позволяют системно охарактеризовать эти ограничения.

Надёжное разделение геометрических изомеров C16:1n-7, C18:1n-9 и C18:2n-6 на ГХ требует применения длинных капиллярных колонок (60–100 м) с высокополярной неподвижной фазой на основе цианополисилоксанов (DB-23, SP-2560, BPX-70) либо колонок на основе ионных жидкостей [73, 82]. Согласно имеющимся в литературе сравнительным данным, разрешение отдельных пар *цис*- и *транс*-изомеров C18:1 на колонках с высокополярной неподвижной фазой может не превышать 0,5–0,6 [82, 190], что исключает их корректное количественное определение в одном цикле без дополнительного фракционирования. Применяемые для решения этой задачи альтернативы, например, двумерная ГХ либо предварительная твердофазная экстракция на фазах с нанесенными на них ионами серебра, существенно усложняют пробоподготовку и ограничивают пропускную способность анализа [82, 220]. На этом фоне результаты, полученные нами в разделе 3.1.3, представляют отдельный методологический интерес: разработанный метод обеспечивает разделение *цис*- и *транс*-изомеров МЭЖК C16:1n-7, C18:1n-9 и C18:2n-6 на стандартной обращённо-фазовой колонке C8 длиной 100 мм в одном аналитическом цикле без каких-либо дополнительных этапов фракционирования [93]. Возможность одновременного количественного определения *цис*- и *транс*-изомеров без увеличения сложности пробоподготовки имеет прямое значение для оценки фармакологически релевантного баланса геометрических изомеров ЖК в плазме и эритроцитах.

Пламенно-ионизационный детектор не обладает структурной селективностью и идентифицирует соединения исключительно по времени удерживания, что при совместном элюировании изомеров приводит к ошибкам количественного определения [41]. Использование электронной ионизации в ГХ-МС повышает специфичность за счёт регистрации масс-спектров фрагментов, однако в случае МЭЖК с одинаковым числом атомов углерода и одинаковой степенью ненасыщенности спектры практически идентичны [90], что не позволяет надёжно разрешать совместно элюирующиеся изомеры на спектральном уровне.

Полученные в разделе 3.1.4.1. валидационные характеристики разработанного метода [93] подтверждают, что переход к тандемной масс-спектрометрии в режиме MRM с регистрацией индивидуальной пары ион-прекурсор/ион-продукт для каждой ЖК обеспечивает специфичность, недостижимую в рамках классических газохроматографических подходов.

Газохроматографические подходы традиционно предусматривают предварительную экстракцию липидов по методу Фолча [101] или Блайя-Дайера [54] с последующей переэтерификацией. Многоступенчатая процедура увеличивает общую длительность анализа и является источником как случайных, так и систематических погрешностей, особенно при работе с малыми объёмами биологических проб. Одностадийная этерификация/переэтерификация непосредственно в биологическом образце объёмом 40 мкл с использованием раствора BF_3 в метаноле, реализованная в разработанном методе [93], существенно упрощает рабочий процесс. Это обстоятельство имеет прямое значение для интеграции метода в клинико-фармакологическую практику, в том числе при работе с ограниченным количеством биологического материала, характерным для педиатрических исследований и работы с архивными образцами.

Перечисленные ограничения газохроматографических подходов не отрицают их пригодности для общего профилирования ЖК, что подтверждается их многолетним успешным применением в липидном анализе. Вместе с тем задачи клинической фармакологии предъявляют более высокие требования: одновременное определение как доминирующих, так и минорных компонентов, разделение геометрических изомеров без предварительного фракционирования и работа с малым объёмом биологической пробы. По совокупности этих критериев разработанный метод [93] обладает очевидными преимуществами перед существующими ГХ-подходами.

В литературе описан ряд подходов ВЭЖХ-МС/МС для количественного анализа ЖК, которые целесообразно условно разделить на три группы. Каждая из них сопоставлена ниже с разработанным методом по критериям пригодности для оценки метаболизма ЖК.

Низкая полярность ЖК и ограниченная эффективность их депротонирования в источнике ЭРИ обусловливают сравнительно невысокую чувствительность данного подхода [58, 74]. Опубликованные методики этой группы, как правило, ограничены количественным определением 4-5 наиболее высококонцентрированных ПНЖК, таких как ДГК, ЭПК, АК, линолевой и α-линоленовой кислот [124, 249, 299, 303]. Подобная аналитическая широта недостаточна для оценки метаболизма ЖК, поскольку для расчета индексов активности ферментов FADS1 и FADS2, ELOVL2 и ELOVL5, и SCD1 требуется одновременное определение как субстратов, так и продуктов соответствующих ферментативных превращений [199]. В этих условиях относящиеся к минорным компонентам НЖК с очень длинной цепью (C22:0, C24:0), МНЖК (C20:1n-9, C24:1n-9) и *транс*-изомеры остаются ниже пределов количественного определения. Разработанный метод [93], охватывающий 23 аналита, включая указанные минорные компоненты, преодолевает данное ограничение.

Для повышения эффективности ионизации в ЭРИ предложен ряд подходов, основанных на ковалентном присоединении к карбоксильной группе фрагментов с постоянным положительным зарядом: N-(4-аминометилфенил)пиридиния, пиколиниловых эфиров, диметилоксазолинов, холиновых эфиров [58, 59, 74, 191]. Чувствительность подобных методов превосходит традиционные подходы более чем на четыре порядка [59], однако их клинико-фармакологическое внедрение сопряжено с ограничениями: низкой коммерческой доступностью дериватизирующих реагентов, отсутствием стандартизированных протоколов пробоподготовки, необходимостью индивидуальной оптимизации условий дериватизации для каждого класса соединений и ограниченной доступностью соответствующих стандартных образцов [74]. Применённая в разработанном методе [93] этерификация/метилирование ЖК с получением МЭЖК является общепринятым стандартом липидного анализа, что обеспечивает межлабораторную сопоставимость результатов и совместимость с существующей аналитической инфраструктурой клинических лабораторий. Это практически значимое преимущество для исследований, проводимых в нескольких центрах.

Подходы, основанные на пост-колоночной подаче растворов солей бария, меди или других катионов для образования положительно заряженных аддуктов ЖК непосредственно перед источником ионизации [35, 126, 191, 299], технически сложны, требуют дополнительных насосных модулей и не получили широкого распространения в клинико-фармакологической практике.

Принципиальная новизна разработанного метода [93] в контексте подходов ВЭЖХ-МС/МС заключается в количественном определении ЖК в форме аммонийных аддуктов МЭЖК $[M+NH_4]^+$ при ЭРИ в положительном режиме. По результатам литературного анализа, проведённого на момент подготовки публикации, не было обнаружено других методов ВЭЖХ-МС/МС с ЭРИ, в которых задача одновременного количественного определения 23 ЖК (включая *цис*- и *транс*-изомеры МЭЖК C16:1n-9, C18:1n-9 и C18:2n-6) в форме аммонийных аддуктов была бы решена в едином аналитическом цикле для расчета омега-3 индекса в цельной крови и эритроцитарной массе. Единственная описанная работа с применением аммонийных аддуктов МЭЖК для профилирования ЖК в эритроцитах базировалась на газохроматографическом разделении и химической ионизации, а не ЭРИ [243]. Таким образом, на сегодняшний день разработанный метод ВЭЖХ-МС/МС представляет новый подход к количественному определению ЖК, что определяет его методологическое значение для соответствующего класса клинико-фармакологических задач.

Существенным критерием пригодности аналитической методики для оценки метаболизма ЖК служит возможность одновременного количественного определения соединений, необходимых для расчета индексов функциональной активности ферментов биосинтеза и ремоделирования ЖК [141, 199]. Разработанная методика ВЭЖХ-МС/МС охватывает аналиты, позволяющие рассчитывать маркерные соотношения, отражающие активность ключевых ферментных звеньев метаболизма ЖК: для SCD1 – C18:1n-9/C18:0 и C16:1n-7/C16:0; для FADS1 – C20:4n-6/C20:3n-6; для FADS2 – C18:3n-6/C18:2n-6 и C20:3n-6/C18:3n-6; для ELOVL6 – C18:0/C16:0; для ELOVL2 и ELOVL5 – C22:4n-6/C20:4n-6, ДПК/ЭПК и ДГК/ДПК; для ELOVL1 и ELOVL3 – C20:0/C18:0, C22:0/C20:0 и

3C24:0/C22:0 [91, 93, 141, 199]. Возможность одновременной оценки субстратов и продуктов каждого ферментативного звена в единой биологической пробе позволяет сопоставлять изменения соотношений ЖК с предполагаемым участием соответствующих ферментных звеньев [91].

Указанная полнота охвата аналитов имеет непосредственное значение в контексте оценки плейотропных эффектов статинов. Известно, что плейотропные эффекты статинов, выходящие за рамки ингибирования ГМГ-КоА-редуктазы и снижения ХС ЛПНП, реализуются, в том числе, через модуляцию активности ферментов десатурации и элонгации ЖК [106, 206, 230]. Полученные в настоящей работе результаты (главы 3.4 и 3.5) хорошо согласуются с этой концепцией: у пациентов, получающих терапию статинами, выявлены статистически значимые изменения трёх классов показателей ЖК [91]. Снижение уровня АК согласуется с гипотезой о модуляции ферментых звеньев FADS1 и ELOVL5, участвующих в синтезе длинноцепочечных омега-6 ПНЖК из линолевой кислоты, и подтверждает данные ранее опубликованных исследований [179, 203, 206, 231]. Устойчивое снижение соотношения C18:0/C18:1n-9 во всех подгруппах пациентов указывает на модуляцию активности SCD1 [199], но отсутствие статистически значимой разницы между подгруппами позволяет сделать вывод об ограниченном воздействии изучаемого режима терапии статинами [203]. Изменение соотношения ДПК/ДГК, выявленное в подгруппе пациентов, получавших аторвастатин, может отражать замедление конверсии ДПК в ДГК и потенциальные различия во влиянии отдельных представителей группы статинов на ферментные системы пути биосинтеза омега-3 [189]. Принципиально важно, что количественная оценка всех перечисленных показателей в рамках единого аналитического цикла стала возможной именно благодаря полноте охвата аналитов разработанным методом [93]. Также разработка нового маркера баланса омега-3 и омега-6 ПНЖК явилась следствием полноты охвата фармакологически значимых метаболитов в одном анализе [92]. Реализация подобной комплексной оценки на основе традиционных методов с пламенно-ионизационным детектированием с ограниченным охватом

аналитов или методов ВЭЖХ-МС/МС в отрицательном режиме была бы практически невозможна.

Дополнительным значимым аспектом является возможность количественного определения *транс*-изомеров ЖК (С16:1 транс, С18:1 транс, С18:2 транс), реализованная в разработанном методе. *Транс*-изомеры, поступающие преимущественно с продуктами промышленной переработки жиров, признаны независимым фактором риска развития ССЗ и провоспалительных состояний [195, 264]. Их количественная оценка имеет значение при интерпретации плейотропных эффектов статинов, поскольку позволяет учитывать вклад экзогенных алиментарных факторов в наблюдаемую вариабельность жирнокислотного профиля и снижает риск ошибочного отнесения этих изменений к собственно фармакологическим эффектам [93].

Совокупный анализ полученных в настоящей работе результатов в контексте существующих методологических подходов позволяет сформулировать следующее заключение о методологическом значении разработанной аналитической методики. Метод ВЭЖХ-МС/МС [93] объединяет преимущества высокой специфичности тандемного масс-спектрометрического детектирования в режиме MRM, хроматографического разделения *цис*- и *транс*-изомеров на стандартной обращённо-фазовой колонке С8, одностадийной пробоподготовки малого объёма биологической пробы (40 мкл) и количественного охвата 23 аналитов, необходимых для оценки метаболизма ЖК и плейотропных эффектов статинов. Валидация метода в соответствии с требованиями EMA [94] подтверждает его пригодность для применения в клинико-фармакологических исследованиях. На сегодняшний день это единственный метод ВЭЖХ-МС/МС с ЭРИ, обеспечивающий одновременное количественное определение 23 ЖК в форме аммонийных аддуктов МЭЖК с разделением *цис*- и *транс*-изомеров в объёме биологической пробы 40 мкл применительно к задаче определения омега-3 индекса и комплексной оценки метаболизма ЖК [93, 243]. Полнота охвата аналитов и аналитические характеристики метода обосновывают его применение в настоящем исследовании для оценки плейотропных эффектов статинов у

пациентов с атеросклерозом и определяют перспективы его дальнейшего использования в клинико-фармакологической практике, в том числе для индивидуализации гиполипидемической терапии и оценки её эффективности.

Математическая модель пересчёта омега-3 индекса из плазменных данных: фармакологическое значение и сопоставление с существующими подходами. Результатом данной работы стал математический инструмент для повышения клинической полезности профилирования ЖК. Хотя анализ ЖК является хорошо зарекомендовавшим себя методом в липидомике и исследованиях сердца и сосудов, в настоящее время не существует стандартизированного подхода для преобразования значений ЖК между различными фракциями крови, такими как плазма, цельная кровь и эритроциты. Это ограничивает сопоставимость результатов между исследованиями, использующими различные типы образцов. Поэтому разработка точных моделей преобразования является приоритетной задачей. Такие модели особенно важны для анализа DBS, которые все чаще используются из-за простоты сбора и хранения [8]. Математические алгоритмы позволяют оценить состав ЖК эритроцитов на основе данных других фракций крови, повышая согласованность и клиническую значимость измерений. Это имеет решающее значение для интеграции плазмы крови и DBS в более широкие клинические и эпидемиологические приложения и согласования их результатов с традиционными образцами венозной крови [99, 258, 267].

Данные исследования показали, что метод линейной регрессии с логит-преобразованием переменных обеспечил более высокую точность прогнозирования при преобразовании значений суммы ЭПК и ДГК в плазме в расчетные уровни эритроцитов по сравнению с моделью X. F. Hu et al. (2017) (R^2 = 0,782 против 0,722) [91, 127]. Модель с логит-преобразованием продемонстрировала большую точность между расчетными и фактическими значениями эритроцитов в анализе Бланда–Альтмана благодаря более узким пределам согласия и более низкому среднему смещению, что повышает ее практическую полезность для клинического применения [91].

Улучшение характеристик, вероятно, связано с тем, что логит-преобразование преобразовывает пропорциональные данные, ограниченные интервалом 0–1, в неограниченное линейное пространство. Это позволяет более корректно применять линейное регрессионное моделирование к процентным биомаркерам, включая омега-3 индекс, и нивелировать статистические артефакты, возникающие при использовании «сырых» пропорций [267, 289].

Калибровка с учетом особенностей населения имеет важное значение, о чем свидетельствуют различия в результатах моделирования. Модель X. F. Hu et al. (2017) основана на результатах глобального метаанализа, в который вошли данные 56 исследовательских проектов, проведенных преимущественно в западных странах [127]. Напротив, наша модель была построена на основе данных о населении России (Московская область), рацион питания которого может отличаться от рациона населения Северной Америки и Западной Европы [91]. В ранее проведённых международных исследованиях были выявлены существенные различия в содержании омега-3 ЖК в крови в разных регионах. Результаты исследований подтверждают необходимость проверки моделей преобразования в местных условиях питания для конкретных целевых групп населения [268].

Для оценки обобщаемости данной модели требуется внешняя валидация на этнически и географически разнообразных когортах, поскольку метаболизм ЖК варьирует в зависимости от характера питания и генетических полиморфизмов, влияющих на активность десатураз и элонгаз [80, 267].

Фармакологическая интерпретация выявленных изменений профиля ЖК на фоне терапии статинами. Настоящее исследование показало, что у пациентов с выраженным атеросклерозом сонных артерий отмечаются значимые изменения профиля ЖК в плазме крови. У этих пациентов сохраняются метаболические нарушения липидного обмена, затрагивающие процессы десатурации и элонгации НЖК, МНЖК и ПНЖК, включая омега-3 (ЭПК и ДГК) и омега-6. Выявленные изменения указывают на комплексную перестройку активности метаболических ферментных систем при атеросклерозе [91, 92].

Полученные данные демонстрируют снижение уровня стеариновой кислоты (C18:0) и повышение уровня олеиновой кислоты (C18:1n-9), сопровождающееся уменьшением соотношения C18:0/C18:1n-9. Этот результат согласуется с гипотезой о повышенной активности SCD1 – Δ9-десатуразы, обеспечивающей превращение НЖК в МНЖК [212]. Кроме того, повышенные уровни МНЖК, в частности олеиновой кислоты, включаются в состав ТГ и эфиров ХС, тем самым способствуя накоплению липидов в стенке артерий. Полученные наблюдения также согласуются с данными ранее опубликованных работ, в которых показана связь активности SCD1 с воспалительными сигнальными путями и формированием пенистых клеток [46, 60].

Наблюдаемые изменения соотношений НЖК (например, повышение C16:0/C18:0, снижение C18:0/C20:0 и повышение C20:0/C22:0) связаны с дисрегуляцией ферментов семейства ELOVL, отвечающих за элонгацию длинно- и очень длинноцепочечных ЖК. Показано, что нарушение активности ELOVL6 влияет на метаболическое равновесие между пальмитатом и стеаратом, тем самым способствуя развитию инсулинорезистентности и сосудистой дисфункции [115]. Также продемонстрировано, что нарушение функций ELOVL1/3 приводит к снижению синтеза очень длинноцепочечных ЖК, необходимых для поддержания целостности мембранных липидов. Следовательно, подобный дисбаланс может приводить к нарушениям стабильности эндотелиальных клеток [175].

Исследование также демонстрирует снижение суммарного уровня ВНЖК у пациентов с атеросклерозом, что поддерживает гипотезу о системном дефиците биосинтеза длинноцепочечных ПНЖК. Тем самым это дополнительно подчёркивает роль нарушенной активности элонгаз (ELOVL2, ELOVL5) и десатуразы (FADS1) в патофизиологии заболевания [91].

У пациентов с атеросклерозом в омега-6 пути отмечались более низкие концентрации C20:3n-6 и АК, а также дисбаланс соотношений «предшественник/продукт» (например, снижение C18:3n-6/C20:3n-6 и повышение C18:2-n6/C20:4n-6) [91]. Полученные результаты могут быть связаны со снижением FADS1 и FADS2. Кроме того, анализ омега-3 выявил уменьшение

содержания ЭПК, суммарного уровня омега-3 и снижение отношения ЭПК/ДПК, что может быть обусловлено нарушением активности десатураз и элонгаз (ELOVL2 и ELOVL5). Снижение образования АК, ЭПК и ДГК приводит к уменьшению продукции противовоспалительных эйкозаноидов и СПМ [180, 197]. Дисбаланс метаболизма n-6 и n-3 способствует повышенной продукции провоспалительных липидных медиаторов, ускоряя прогрессирование бляшек и воспаление сосудистой стенки.

Результаты настоящего исследования показывают потенциальную ценность показателя соотношения НЖК и МНЖК для дифференциации лиц с атеросклерозом от контрольной группы. Более того, данный параметр может быть полезен для выявления пациентов со стойкими метаболическими нарушениями, сохраняющимися несмотря на терапию статинами. Среди всех протестированных индексов отношение C18:0/C18:1n-9 продемонстрировало наиболее высокую дискриминирующую способность, сохраняя информативность при сравнении каждой подгруппы пациентов с контрольной группой (AUC 0,831–0,858; $p < 0,001$) [92].

Данное соотношение отражает активность SCD1, которая играет важную роль в изменении профиля ЖК, печёночном липогенезе и метаболическом гомеостазе. Возможность изменения соответствующего расчётного индекса при применении статинов показана в экспериментальном исследовании [203]. Соотношение C18:0/C18:1n-9 было снижено относительно контроля во всех подгруппах пациентов с атеросклерозом, что может указывать на возможную ключевую роль десатурации C18:0 в патогенезе атеросклероза. Эти результаты согласуются с данными предшествующих исследований, связывающих повышенную активность SCD1 с липогенезом и инсулинорезистентностью при метаболическом синдроме, которые тесно сопряжены с развитием атеросклероза [46, 172].

Таким образом, стабильно более низкое значение соотношение C18:0/C18:1n-9, обнаруженное во всех группах с атеросклерозом по сравнению со контрольной группой, подтверждает целесообразность использования этого параметра в

качестве потенциального метаболического индикатора в будущих исследованиях, оценивающих более широкое воздействие различных методов гиполипидемической терапии [92]. Полученные результаты позволяют предположить ограниченное влияние исследованных режимов терапии на выраженность данного сдвига. При этом сохраняющееся отклонение показателя не исключает воздействия статинов на экспрессию или активность SCD1.

Результаты настоящего исследования показывают, что атеросклероз, особенно у пациентов, получающих терапию статинами, ассоциирован с выраженными изменениями состава ПНЖК в плазме крови [92]. В основном эти изменения затрагивают ЖК, формирующиеся в результате реакций десатурации и удлинения (элонгации) цепи. Хотя уровни дигомо-γ-линоленовой кислоты (C20:3n-6) статистически значимо между группами не различались, устойчиво направленная тенденция к снижению во всех подгруппах атеросклероза указывает на возможное уменьшение активности ранних этапов метаболизма омега-6 [92]. Наблюдаемая тенденция согласуется с данными литературы, согласно которым C20:3n-6 (дигомо-γ-линоленовая кислота) является ключевым промежуточным метаболитом омега-6 каскада и предшественником противовоспалительных производных – простагландинов серии 1 (в частности, PGE1 и 15-HETrE). Снижение её уровня может отражать нарушения ферментативных этапов пути (в первую очередь Δ6-десатурации и последующих превращений), которые описаны при хроническом воспалении и метаболических нарушениях [198].

У пациентов, получавших терапию статинами, было выявлено статистически значимое снижение уровней АК. АК является важным компонентом сердечно-сосудистой системы и предшественником провоспалительных медиаторов [86, 284]. Вероятно, данный эффект обусловлен плейотропными действиями статинов на метаболизм ЖК, включая регуляцию экспрессии десатураз и ингибирование образования провоспалительных липидных медиаторов [179, 231].

Гипотеза о снижении уровней АК в плазме крови в ответ на терапию статинами основана на предположении, что данный эффект реализуется либо через регуляцию ферментов десатурации (прежде всего FADS1), либо за счёт

уменьшения общей скорости липидного обмена/обновления [157]. Как показано в опубликованных исследованиях, терапия статинами снижает доступность провоспалительных субстратов омега-6 ПНЖК, таких как АК, тем самым потенциально уменьшая образование эйкозаноидов [203].

Полученные данные согласуются с результатами другого исследования, в котором показано снижение уровней АК у крыс на фоне применения статинов [203]. Это позволяет предположить, что наблюдаемое снижение АК в данном контексте скорее отражает нарушение её синтеза из линолевой кислоты, чем повышенное потребление для образования специализированных медиаторов в условиях воспаления. Тем самым усиливается гипотеза о том, что статины, особенно розувастатин в нашей когорте, могут нарушать активность ферментов элонгирования (ELOVL5) и десатурации (FADS1), участвующих в синтезе предшественников АК [244].

Вместе с тем следует отметить, что опубликованные данные об уровнях АК остаются неоднозначными. Липидомное профилирование в крупных когортах людей показало, что статины, как правило, снижают абсолютные концентрации ПНЖК, особенно омега-6, тогда как процентное содержание отдельных ЖК в составе общего пула ЖК нередко остаётся относительно стабильным [262]. В ряде исследований, напротив, сообщалось о повышенных концентрациях АК у пациентов с атеросклерозом, что указывает на возможную зависимость динамики АК от стадии заболевания, типа биоматериала и/или методических различий [270].

Примечательно, что уровни АДК, образующейся в результате удлинения цепи АК, статистически значимо не изменялись. Несмотря на это, отношение C20:4n-6 к C22:4n-6 было статистически значимо снижено во всех группах пациентов. Это может указывать на уменьшение активности процессов удлинения цепи, что не выявляется при анализе только абсолютных уровней ЖК. Следовательно, отношение C20:4n-6/C22:4n-6 может быть более чувствительным показателем активности ELOVL2 и ELOVL5 по сравнению с уровнем АДК [92].

Среди омега-3 ЖК наиболее выраженное снижение было отмечено для ЭПК, особенно у пациентов, получавших розувастатин, а также у пациентов без терапии

статинами [92]. ЭПК является ключевым предшественником биосинтеза резолвинов серии Е – семейства липидных медиаторов, способствующих разрешению воспаления. Следовательно, снижение уровней ЭПК может ограничивать способность организма эффективно завершать воспаление в сосудистой стенке [252, 255].

Ранее было показано, что у пациентов, получающих терапию статинами и имеющих низкие уровни омега-3, может сохраняться персистирующее сосудистое воспаление [142, 226]. Данные клинических исследований свидетельствуют о том, что добавление высокоочищенного ЭПК (икосапент этил) к терапии статинами снижает частоту ССС. Вместе с тем влияние на уровни воспалительных биомаркеров, а также эффекты других форм омега-3, описываются менее последовательно [57]. В совокупности эти результаты позволяют предположить, что омега-3-добавки целесообразно рассматривать в качестве дополнения к терапии статинами для снижения остаточного сосудистого воспаления, особенно у лиц с низким омега-3-статусом [125, 203].

Следует отметить, что в подгруппе розувастатина доля ЭПК была статистически значимо ниже контрольной, тогда как в подгруппе аторвастатина различие с контролем не достигало статистической значимости [92]. В опубликованной литературе показано, что ряд статинов, включая аторвастатин и розувастатин, в некоторых когортах ассоциирован со снижением циркулирующих уровней ЭПК и ДГК. Однако результаты варьируют в зависимости от популяции и типа биологического материала. Прямых сравнительных данных, однозначно подтверждающих, что розувастатин снижает ЭПК в большей степени, чем аторвастатин, недостаточно, поэтому данное наблюдение следует интерпретировать с осторожностью [53]. Розувастатин, как правило, более эффективно снижает уровень ХС ЛПНП по сравнению с аторвастатином и обладает выраженным воздействием на печёночный метаболизм, что потенциально может играть роль в изменениях метаболизма ЖК [51].

Статистически значимое снижение отношения ЭПК/ДГК во всех группах атеросклероза указывает на изменение нормального соотношения между

предшественниками омега-3 и их более длинноцепочечным продуктом [205]. Данное отношение нередко используют как показатель эффективности превращений омега-3 ЖК и как косвенное отражение активности путей десатурации и удлинения цепи [113]. Устойчивое снижение этого показателя позволяет предположить либо уменьшение синтеза ЭПК, либо преимущественное вовлечение ЭПК в метаболизм, в том числе, с возможным образованием противовоспалительных медиаторов. В более общем виде снижение ЭПК может ограничивать способность сосудистой стенки формировать сигналы, обеспечивающие разрешение воспаления. Такая механистическая взаимосвязь хорошо обоснована, однако её клинические последствия зависят от особенностей питания, анализируемой матрицы и генетических факторов [193].

Подгрупповой анализ выявил два изменения в звене ЭПК→ДПК→ДГК, локализованных в подгруппе аторвастатина. Во-первых, снижение соотношения ЭПК/ДПК достигало статистической значимости только в этой подгруппе (по сравнению с контрольной группой; p = 0,0290). Во-вторых, при сравнении подгрупп аторвастатина и розувастатина отмечено умеренное, но статистически значимое увеличение соотношения ДПК/ДГК (p = 0,0206) [92]. Поскольку ДПК является промежуточным звеном метаболического пути омега-3 между ЭПК и ДГК, повышение отношения ДПК/ДГК может указывать на замедление превращения ДПК в ДГК [266]. В нашей выборке различия между группами пациентов, получавших аторвастатин и розувастатин, позволяют предположить, что эти препараты могут в небольшой степени по-разному влиять на ферментные системы данного пути. Соответственно, наблюдаемое увеличение отношения ДПК/ДГК в группе аторвастатина может отражать более слабое влияние аторвастатина на данную ферментную систему по сравнению с розувастатином. Вместе с тем, недавние экспериментальные данные показывают, что статины способны регулировать и в ряде случаев индуцировать экспрессию FADS и ELOVL, а не подавлять её [134, 270], поэтому приведённые интерпретации следует рассматривать как предварительные и требующие дальнейшей проверки.

В совокупности полученные результаты поддерживают гипотезу о том, что терапевтическое действие статинов обусловлено не только снижением ХС ЛПНП, но и влиянием на метаболизм ПНЖК [53]. Определены звенья, расчетные индексы активности которых связаны с плейотропным действием терапии статинами, включая FADS1 и ELOVL5 в пути метаболизма омега-6 ПНЖК, а также ELOVL2 и FADS2 в пути метаболизма омега-3 ПНЖК, с различиями между аторвастатином и розувастатином по соотношению ДПК/ДГК и снижением соотношения ЭПК/ДПК, выявленным только в подгруппе аторвастатина. При этом звено SCD1, оцениваемое по соотношению C18:0/C18:1n-9, сохраняло снижение относительно контрольной группы во всех подгруппах пациентов с атеросклерозом при отсутствии статистически значимых различий между ними [92]. Такое сочетание результатов позволяет предположить ограниченное влияние исследованных режимов терапии на выраженность отдельных метаболических сдвигов. Сохранение информативности соответствующих показателей послужило основанием для разработки комбинированного подхода к оценке профиля ЖК при терапии статинами.

Сопоставление данных по стандартным показателям липидного профиля с данными опубликованных исследований. Было показано, что терапия статинами модифицирует взаимосвязь между омега-3 ЖК в плазме крови и липидными маркерами, тем самым, влияя на развитие атеросклероза. У пациентов, ранее не получавших терапию статинами, суммарные уровни омега-3 ЭПК и ДГК были тесно связаны с более благоприятным липидным профилем, включая обратную корреляцию с ТГ ($R^2 = 0{,}453$; $p = 0{,}047$) и положительную корреляцию с ХС ЛПВП ($R^2 = 0{,}626$; $p = 0{,}011$). Эти результаты подтверждают, что омега-3 ЖК улучшают функциональные свойства ЛПВП и снижают атерогенность липопротеинов через известные механизмы [154]. В группе пациентов без терапии статинами также наблюдались обратные тенденции для ХС ЛПОНП, ХС ЛПНП и ОХС, что согласуется с ролью омега-3 ЖК в подавлении печёночного липогенеза и усилении β-окисления [132, 196].

У пациентов, получавших терапию статинами, статистические взаимосвязи между омега-3 ЖК и липидными маркерами оставались слабыми и статистически незначимыми, поскольку статины оказывают выраженное влияние на уровни ХС ЛПНП и ТГ, потенциально маскируя дополнительный вклад омега-3 ЖК [159, 279].

Наши данные показывают, что терапия статинами снижает выраженность корреляций между суммой ЭПК и ДГК (омега-3 статусом) и показателями липидного профиля, что усложняет интерпретацию биомаркеров [92]. Возможным объяснением является то, что выраженное снижение ХС ЛПНП и ТГ под влиянием статинов может «скрывать» вклад омега-3 ЖК в вариабельность этих показателей. Кроме того, статины могут вызывать изменения метаболизма ЖК (например, за счёт модификации активности десатураз и элонгаз или снижения продукции воспалительных липидов), что, в свою очередь, изменяет взаимосвязь между уровнем омега-3 и липидным профилем [157, 179, 259]. У пациентов, не принимавших статины, омега-3 ЖК продемонстрировали ожидаемую положительную корреляцию с липидными показателями, тогда как при терапии статинами эта корреляция ослаблялась фармакологическим действием статинов [92].

Далее была проведена стратификация пациентов на фоне терапии статинами, дополнительно принимавших β-адреноблокаторы. По литературным данным β-адреноблокаторы способны умеренно повышать уровень ТГ и снижать ХС ЛПВП, причём выраженность эффекта зависит от селективности конкретного препарата и индивидуальных особенностей пациента [47]. Имеются также сведения о возможном ослаблении липидмодулирующего эффекта омега-3 ЖК на фоне приёма β-адреноблокаторов преимущественно за счёт влияния на печёночный липидный метаболизм и клиренс липопротеинов [61, 123, 161].

В настоящей выборке описательный корреляционный анализ в подгруппах «Статин + β-адреноблокаторы» и «Только статин» (раздел 3.3.3) не выявил статистически значимых ассоциаций уровней омега-3 ЖК с показателями стандартного липидного профиля ни в одной из подгрупп. Полученный результат согласуется с представлением о ведущей роли терапии статинами в формировании наблюдаемого ослабления омега-3 ассоциаций. Вместе с тем, ввиду ограниченного

объёма подгрупп (n = 25 и n = 15, соответственно) полученные данные следует рассматривать как ориентировочные; уверенное исключение слабого модифицирующего эффекта β-адреноблокаторов требует подтверждения на проспективной когорте увеличенного объёма [91].

В целом полученные данные указывают на ограниченное влияние омега-3 ЖК на липидный профиль, вероятно маскируемое плейотропным действием статинов [132]. Сходная картина при наличии и отсутствии сопутствующей терапии β-блокаторами позволяет предположить ведущую роль статинов в ослаблении этих взаимосвязей [91].

Эти результаты подчеркивают, что профили омега-3 являются информативными у пациентов, ранее не принимавших статины, и могут служить средством для индивидуальных стратегий управления липидным профилем при минимизации фармакологических факторов. Интерпретация биомаркеров на основе омега-3 ЖК для оценки ССР должна проводиться с учетом сопутствующей фармакотерапии [92].

Сравнительная информативность традиционных и новых показателей метаболизма ЖК при терапии статинами. Разработанный ИБ о-6/о-3 объединяет соотношения длинноцепочечных ПНЖК, участвующих в путях десатурации и элонгации. Такой подход позволяет комплексно характеризовать состав плазменного пула ПНЖК и выявлять метаболические сдвиги, сохраняющиеся у пациентов при терапии статинами [92].

Мы сопоставили традиционные индексы и соотношения, включая «Омега-3 статус», отношение омега-6/омега-3 и отношение АК/ЭПК, а также соотношения, отражающие активность метаболических путей, оцененных в настоящей работе [81]. Традиционные индексы, рассчитанные по данным плазмы крови, продемонстрировали низкую или удовлетворительную дискриминирующую способность: значения AUC, как правило, находились в диапазоне 0,55–0,64, а *p*-значения в подгруппах аторвастатина и розувастатина часто не достигали статистической значимости. Следовательно, на фоне терапии статинами дискриминирующая способность этих показателей снижается [92].

В отличие от этого, отношение АК к АДК (C20:4n-6/C22:4n-6) обеспечивало воспроизводимую и статистически значимую разделительную способность во всех группах пациентов: значение AUC составило 0,669 в подгруппе розувастатина (p = 0,026), и 0,741 в подгруппе аторвастатина (p = 0,002). Это указывает на то, что процессы удлинения цепи, преимущественно регулируемые ферментами ELOVL2 и ELOVL5, являются более информативным отражением метаболизма ПНЖК по сравнению с оценкой абсолютных концентраций отдельных ЖК [92].

Низкая диагностическая эффективность традиционных ПНЖК-ассоциированных индексов, рассчитанных по данным плазмы крови, может быть обусловлена несколькими факторами, связанными как с терапией статинами, так и со специфическими особенностями плазменного пула. Статины способны регулировать липидный обмен, включая активность десатураз и элонгаз, а суммарные сдвиги в этих путях могут уменьшать межгрупповые различия при использовании простых плазменных соотношений [236, 270]. Концентрации ПНЖК в плазме также зависят от потребления пищи, быстрого метаболизма и особенностей транспорта ЖК, вследствие чего они в меньшей степени отражают долговременные метаболические изменения или активность ферментов на тканевом уровне [265]. В результате плазменные соотношения могут оставаться «нормальными» даже при нарушении процессов синтеза или разрешения воспаления. В совокупности с низкой диагностической ценностью традиционных соотношений ЖК в плазме крови эти данные подтверждают необходимость разработки более чувствительных показателей профиля ЖК, сохраняющих информативность при терапии статинами, для корректной оценки метаболизма ПНЖК у популяций пациентов с ССЗ.

В связи с этим был выполнен комбинированный анализ показателей АК, АДК, ЭПК, ДПК и ДГК с выбором наилучшего сочетания по диагностическим характеристикам. В результате в формулу были включены метаболические соотношения C20:4n-6/C22:4n-6, ЭПК/ДГК и ДПК/ДГК, отражающие изменения активности ферментов ELOVL2/5 и FADS1/2 [92].

Выбранные ЖК являются ключевыми продуктами метаболизма ЖК и служат предшественниками широкого спектра физиологически активных липидных медиаторов. К ним относятся простагландины, тромбоксаны и лейкотриены, образующиеся из АК; резолвины серии E, образующиеся из ЭПК; резолвины серии D, протектины и марезины, образующиеся из ДГК; а также липоксины, синтез которых связан с АК и ЭПК [48, 77, 105, 252]. Кроме того, АК является субстратом для эндоканнабиноидов, таких как анандамид и 2-арахидоноилглицерол. Для ЭПК и ДГК описаны параллельные реакции с образованием этаноламидных аналогов, включая эйкозапентаеноилэтаноламид и докозагексаеноилэтаноламид, обладающих противовоспалительными и нейропротективными свойствами [137, 260]. Указанные медиаторы оказывают регуляторное влияние на воспаление, сосудистый тонус, иммунную активность и нейрональную передачу сигналов.

Наконец, АДК является продуктом удлинения цепи АК и может использоваться в качестве маркера нарушений метаболизма АК [78]. АДК образуется из АК путём удлинения цепи и может подвергаться ретроконверсии обратно в АК в результате пероксисомного β-окисления [287]. Эта обратимая стадия способствует поддержанию относительно стабильного пула АК, необходимого для синтеза сигнальных молекул, таких как простагландины и лейкотриены. Таким образом, АДК функционирует как метаболический «резервуар», обеспечивающий постоянную доступность АК, а отношение C20:4n-6/C22:4n-6 отражает баланс между процессами удлинения цепи и ретроконверсии в омега-6 пути [92].

Сочетание показателей, обладавших наибольшей дискриминирующей способностью при сравнении изученных групп и имеющих подтверждённую клиническую значимость, послужило основой для разработки ИБ о-6/о-3. Данный расчетный показатель позволяет на уровне интерпретации оценить, в какую сторону смещён профиль ПНЖК у пациента – в сторону преобладания омега-6 АК, ассоциированного с провоспалительным потенциалом, либо в сторону более благоприятного состояния с повышением содержания АДК и ДПК, связанного с разрешением воспаления [92].

ИБ о-6/о-3 был эмпирически рассчитан для суммарной оценки многоэтапных изменений в путях омега-3 и омега-6. Мы включили ДПК наряду с ЭПК и ДГК, поскольку ЭПК, являясь более ранним предшественником, характеризуется большей кратковременной вариабельностью в плазме крови по сравнению с ДГК, особенно после приёма пищи и в постпрандиальный период [242]. Включение промежуточного метаболита ДПК в индекс преследовало две цели. Во-первых, это снижает влияние выбросов в данных по ЭПК. Во-вторых, сохраняется информация о метаболическом пути за счёт учёта звена ЭПК → ДПК → ДГК, а не полагаясь исключительно на ЭПК [92].

Для ограничения гетероскедастичности, обусловленной выраженной асимметрией распределения показателей омега-3, применяли простое преобразование, стабилизирующее дисперсию: извлекали квадратный корень из произведения ЭПК × ДПК. Такой подход является стандартным для правосторонне асимметричных биохимических показателей и повышает устойчивость оценки без искажения ранговых соотношений [129, 156]. Объединение частично коррелирующих липидных маркеров в единый интегральный показатель соответствует общепринятым подходам в исследованиях биомаркеров: в подобных работах многомаркерные модели часто обеспечивают более высокую дискриминирующую способность по сравнению с отдельными индексами [144, 297].

Кроме того, предлагаемый композитный индекс согласуется с формирующейся в настоящее время доказательной базой, указывающей на параллельные пути биосинтеза ДГК. Согласно классическому пути Шпрехера, ЭПК удлиняется до ДПК, далее происходит удлинение до 24:5n-3, десатурация до 24:6n-3 и пероксисомное укорочение цепи с образованием ДГК. Вместе с тем в последние годы описан альтернативный маршрут, предполагающий прямую Δ4-десатурацию ДПК до ДГК. Данные, полученные на ряде моделей позвоночных, показали, что активность данного пути может быть выше, чем предполагалось ранее [189, 207]. Одновременное включение ЭПК, ДПК и ДГК позволяет ИБ о-6/о-3 учитывать вариабельность как по «пути Шпрехера», так и по пути Δ4-десатуразы, тем самым снижая влияние колебаний ЭПК в плазме крови и более адекватно

отражая общую эффективность метаболизма длинноцепочечных омега-3 ЖК [189, 281].

Другими словами, ИБ о-6/о-3 представляет собой комплексный показатель соотношений метаболитов нескольких этапов обмена длинноцепочечных ПНЖК, включая Δ4-, Δ5- и Δ6-десатурацию и элонгацию [78, 92]. Регуляция этих путей связана, в частности, с транскрипционными факторами PPAR-α и SREBP-1c. Например, PPAR-α способствует окислению длинноцепочечных ЖК и может модулировать профили ПНЖК. В то же время SREBP-1c регулирует гены, участвующие в синтезе липидов, и влияет на баланс между длинноцепочечными НЖК, МНЖК и ПНЖК [46, 153]. Подход, предполагающий интеграцию нескольких метаболических путей в единый показатель, вместо использования отдельного индекса по одной ЖК, ранее обсуждался в литературе [118, 139, 183, 251]. Однако до последнего времени не предлагалось единой формулы, объединяющей несколько соотношений метаболических путей ПНЖК в один диагностический индекс, что подчёркивает оригинальность представленных в настоящей работе показателей [92].

ИБ о-6/о-3 достигал максимальных значений у контрольной группы, тогда как у пациентов с атеросклерозом снижался примерно на 30 %, что отражает изменение соотношений включённых в индекс ПНЖК. По данным ROC-анализа данный индекс продемонстрировал хорошую дискриминирующую способность: значения AUC при сравнении подгрупп пациентов с контрольной группой составляли приблизительно 0,73–0,78 и статистически значимо превышали уровень случайной классификации. Примечательно, что индекс сохранял информативность у пациентов на терапии статинами, тогда как традиционные индексы утратили чувствительность. Так, у пациентов без терапии статинами «Омега-3 статус», отношение омега-6/омега-3 или АК/ЭПК демонстрировали удовлетворительную прогностическую ценность, однако в подгруппах, получавших статины, значения AUC снижались примерно до 0,55–0,64 и переставали достигать статистической значимости [92].

Полученный результат согласуется с ранее опубликованными данными, включая работу T. Nozue et al. (2013), в которой показано, что прогрессирование бляшки у пациентов на терапии статинами связано с изменениями отношения омега-3/омега-6; при этом регресс атеромы наблюдался только у пациентов, у которых это соотношение улучшалось, вероятно, вследствие особенностей питания или приёма добавок [205]. Результаты настоящего исследования позволяют рассматривать ИБ о-6/о-3 как показатель сохраняющихся изменений соотношений длинноцепочечных ПНЖК у пациентов с атеросклерозом, в том числе получающих терапию статинами. Сохранение дискриминирующей способности индекса обосновывает перспективность его применения в исследованиях метаболического ответа на различные режимы гиполипидемической терапии [92].

Для повышения дискриминирующей способности по сравнению с отдельными маркерами мы построили наиболее парсимоничную (минимально достаточную) логит-модель, включающую два предиктора: соотношение C18:0/C18:1n-9 (НЖК/МНЖК) и ИБ о-6/о-3 [92]. Концептуальная основа построения такой комбинированной диагностической формулы опиралась на работу C. Li et al. (2025) [163]. В этой работе было показано, что включение нескольких параметров в единую логит-модель может существенно повысить диагностическую точность.

Для построения модели использовали объединённый набор данных, включающий контрольную группу и пациентов с атеросклерозом, без стратификации по факту приёма статинов, поскольку объёмы выборок в отдельных подгруппах были недостаточны для устойчивого многомерного моделирования и повышали риск переобучения в соответствии с рекомендациями TRIPOD и требованиями к объёму выборки [79, 229]. Построение подгруппоспецифической многомерной модели рассматривается как задача будущего исследования на более крупной проспективной когорте. Для предварительного отбора предикторов и уменьшения избыточности применяли метод LASSO, после чего отобранные переменные включали в многофакторную модель логистической регрессии (логит-модель). В итоговую модель вошли отношение C18:0/C18:1n-9 и ИБ о-6/о-3 с

отрицательными коэффициентами, что означает: более низкие значения любого из этих показателей ассоциированы с большей вероятностью наличия атеросклероза (таблица 3.17) [92]. Такой подход соответствует общепринятой практике, согласно которой объединение комплементарных биомаркеров может обеспечивать более высокие значения AUC по сравнению с любым из отдельных компонентов [163, 272].

Для сопоставления ROC-кривых применяли непараметрические методы, а пороговые значения классификации выбирали путём максимизации статистики Юдена (*J*). Для выбранных порогов приводили значения чувствительности, специфичности и 95 % ДИ. Такой подход широко используется для преобразования непрерывных показателей в практические правила принятия решений [83, 295].

Комбинированная логит-модель, построенная на основе соотношения C18:0/C18:1n-9 и ИБ о-6/о-3, показала высокую дискриминирующую способность (AUC = 0,880, точность = 78,6 %, чувствительность = 84,0 %, специфичность = 72,9 %). Эти показатели были заметно выше, чем при использовании отдельных индексов: даже лучший отдельный маркер, C18:0/C18:1n-9, имел AUC 0,83–0,86, тогда как ИБ о-6/о-3 сам по себе имел AUC 0,73–0,78 [92].

Таким образом, объединённое уравнение продемонстрировало более высокую дискриминирующую способность при межгрупповом сравнении, чем каждый из включённых показателей в отдельности [92]. Вероятно, это связано с тем, что оно объединяет взаимодополняющие биологические данные: изменения МНЖК, отражающие активность SCD1, и многоэтапные процессы десатурации и элонгации (удлинения) цепи ПНЖК, имеющие прямое отношение к патогенезу атеросклероза. Внешняя валидация, анализ кривых принятия решений и предварительно специфицированные модели/анализ подгрупп для каждого типа статинов целесообразны в более крупных когортах и рекомендуются руководствами по отчётности [69, 79].

Перспективы клинического применения разработанных методологических и биомаркерных подходов для индивидуализации фармакотерапии атеросклероза. Полученные в настоящей работе результаты формируют методологическую и биомаркерную основу для дальнейших клинико-

фармакологических исследований метаболизма ЖК при атеросклерозе. Ниже рассмотрены пять основных направлений возможного клинического применения:

1. Аналитическая платформа для исследований профиля ЖК;

2. Математическая модель пересчёта омега-3 индекса как инструмент стандартизации оценки омега-3 статуса;

3. Показатели сохраняющихся метаболических сдвигов при терапии статинами в контексте концепции ОВР;

4. Комбинированная логистическая модель как инструмент комплексной оценки состояния метаболизма ЖК и стратификации пациентов с атеросклерозом;

5. Основа для будущих сравнительных исследований липидоснижающей терапии.

Все обозначенные направления рассматриваются как перспективы, требующие последующей валидации в проспективных исследованиях с независимыми когортами увеличенного объёма.

Аналитическая платформа для клинико-фармакологических исследований профиля ЖК. Разработанная методика количественного определения 23 ЖК в форме аммонийных аддуктов метиловых эфиров методом ВЭЖХ-МС/МС обладает рядом характеристик, потенциально релевантных для клинико-фармакологических исследований (раздел 3.1) [93]. Малый объём биологического образца (40 мкл) обеспечивает совместимость с малоинвазивными форматами отбора биоматериала, в том числе с DBS. Совместимость с DBS-форматом подтверждена в собственных исследованиях стабильности омега-3 ЖК на стекловолоконных носителях, в которых установлена высокая корреляция содержания ЖК в DBS с цельной кровью ($R^2 = 0,98$) и сохранение содержания омега-3 ЖК при пропитке носителя 2,6-ди-трет-бутил-4-метилфенолом (БГТ) на уровне 84,7 % в течение трёх недель [8]. Указанные характеристики потенциально расширяют возможности применения метода для амбулаторного мониторинга, ретроспективных исследований архивных коллекций биологических образцов и эпидемиологических работ.

Одновременное количественное определение НЖК, МНЖК, омега-6 и омега-3 ПНЖК, а также *цис*- и *транс*-изомеров C16:1n-7, C18:1n-9 и C18:2n-6 в одном аналитическом цикле позволяет в рамках одной пробы оценивать состояние ферментативных звеньев метаболизма ЖК (SCD1, FADS1/2, ELOVL2/5) на уровне расчетных индексов «продукт/субстрат» (раздел 3.1.4). Это формирует методологическую основу для изучения препаратов, влияющих на метаболизм ЖК, включая ингибиторы ГМГ-КоА-редуктазы [208, 221]. Подход применим и для сравнительных исследований гиполипидемических препаратов и комбинированных схем терапии.

Математическая модель пересчёта омега-3 индекса как инструмент стандартизации оценки омега-3 статуса. Разработанная и валидированная на российской когорте математическая модель пересчёта плазменного содержания суммы ЭПК и ДГК в эквивалент эритроцитарного омега-3 индекса (раздел 3.2) [91] расширяет возможности стандартизованной оценки омега-3 статуса в условиях, когда забор и анализ эритроцитарной фракции ограничены логистикой. Это касается ретроспективных исследований архивных коллекций плазмы, амбулаторного скрининга и фармакологических исследований, в которых применяется забор плазмы по стандартным протоколам клинико-биохимических лабораторий.

С позиций клинической фармакологии разработанная модель применима для стандартизованной оценки омега-3 статуса в исследованиях препаратов омега-3 и комбинированных схем липидоснижающей терапии. Значимость такого направления подтверждают клинические данные. В проспективном исследовании у пациентов на терапии статинами при средних значениях ХС ЛПНП ниже 80 мг/дл низкий плазменный омега-3 индекс (суммарная доля ЭПК и ДГК ниже 3,43 %) был независимым предиктором прогрессирования коронарной атеросклеротической бляшки. Достижение уровня не менее 4 % ассоциировалось с отсутствием прогрессирования [39]. Популяционно-специфическая калибровка моделей пересчёта между фракциями крови (раздел 3.2) [91] обосновывает применение разработанной модели в российских исследованиях.

Показатели профиля ЖК, сохраняющие информативность при терапии статинами. Принципиальной особенностью предложенных показателей профиля ЖК плазмы крови является сохранение их дискриминирующей способности у пациентов на терапии статинами. Соотношение C18:0/C18:1n-9 демонстрирует значения AUC 0,835, 0,858 и 0,831 в подгруппах аторвастатина, розувастатина и пациентов без терапии статинами соответственно, при этом значения Δ Клиффа в указанных сравнениях составляют 0,71, 0,73 и 0,67, что соответствует крупному размеру эффекта (раздел 3.5) [92]. ИБ о-6/о-3 в тех же сравнениях демонстрирует AUC 0,734, 0,780 и 0,741 со значениями Δ Клиффа 0,44, 0,56 и 0,48 (раздел 3.5) [92]. В отличие от этого, традиционные индексы (омега-3 статус по плазме, АК/ЭПК, отношение омега-6/омега-3) у пациентов на фоне терапии статинами утрачивают статистическую значимость, демонстрируя AUC в диапазоне 0,548–0,638 при $p > 0,05$ (раздел 3.5). Поэтому традиционные индексы плохо подходят для оценки пациентов на терапии статинами, тогда как предложенные маркеры сохраняют информативность в этих условиях [92].

С позиций клинической фармакологии предложенные показатели представляют интерес для изучения метаболических сдвигов, сохраняющихся при терапии статинами. Возможность получения дополнительной информации по сравнению со стандартным липидным профилем, в том числе у пациентов с достигнутыми целевыми значениями ХС ЛПНП, требует отдельной проверки. Связь предложенных показателей с ОВР представляет отдельную задачу последующих исследований.

Комбинированная логистическая модель как инструмент комплексной оценки состояния метаболизма ЖК. Комбинированная логит-модель, включающая соотношение C18:0/C18:1n-9 и ИБ о-6/о-3 (раздел 3.5, формула 2), демонстрирует значение AUC, равное 0,880 (95 % ДИ 0,811–0,941), точность классификации 78,6 % и значение Δ Клиффа минус 0,76 (95 % ДИ от минус 0,89 до минус 0,62) при сравнении объединённой группы пациентов с атеросклерозом и контрольной группы. По указанным метрикам комбинированная модель превосходит каждый из включённых в неё индивидуальных биомаркеров [92].

Модель может служить инструментом комплексной оценки состояния метаболизма ЖК при атеросклерозе на фоне терапии статинами.

Для клинического применения комбинированной модели необходимо выполнить несколько условий, общепринятых для биомаркерных исследований: внешнюю валидацию на независимых когортах с предварительным расчетом мощности; анализ кривых принятия решений для оценки клинической полезности; проверку переносимости пороговых значений на иные демографические и этнические группы; подтверждение связи модели с клиническими исходами в проспективных исследованиях. На текущем этапе комбинированная логистическая модель рассматривается как пилотная разработка, открывающая направление для дальнейшей трансляционной работы [92]. Для оценки метаболического ответа необходимо также установить чувствительность показателей и модели к изменениям терапии при повторных измерениях у одних и тех же пациентов.

Основа для будущих сравнительных исследований липидоснижающей терапии. Полученные в настоящем исследовании данные о различиях между подгруппами аторвастатина и розувастатина по соотношению ДПК/ДГК, а также о снижении соотношения ЭПК/ДПК, выявленном только в подгруппе аторвастатина (раздел 3.3.2) [92], указывают на возможность применения разработанного методологического подхода к профилированию ЖК в задачах сравнительной фармакологии гиполипидемических препаратов. Описанные в настоящей работе изменения расчётных индексов десатурации и элонгации на фоне терапии статинами согласуются с экспериментальными данными о различиях между статинами в их плейотропных эффектах: в моделях клеточных линий показана способность аторвастатина усиливать экспрессию генов FADS1, FADS2 и ELOVL5 [134]; для розувастатина в экспериментальной модели неалкогольной жировой болезни печени установлено снижение экспрессии транскрипционного фактора SREBP-1c, регулирующего липогенный путь в печени [293]. Возможные различия во влиянии отдельных статинов на циркулирующие уровни ЭПК и ДГК отмечены в обзорных работах [53]. В проспективных исследованиях предложенный подход позволит оценить изменения профиля ЖК при различных режимах монотерапии и

комбинированного лечения (также приема омега-3 добавок) и сопоставить эти изменения с липидными показателями, воспалительной активностью и клиническими исходами. Совокупность литературных и собственных данных формирует методологическую основу для будущих сравнительных исследований.

В совокупности результаты настоящей работы формируют комплекс методологических и биомаркерных инструментов, потенциально применимых в задачах оценки метаболизма ЖК при атеросклерозе на фоне терапии статинами. Разработанная аналитическая методика, математическая модель пересчёта омега-3 индекса, отдельные показатели, сохраняющие информативность при терапии статинами (соотношение C18:0/C18:1n-9 и ИБ о-6/о-3), и комбинированная логит-модель образуют последовательно выстроенную систему, охватывающую этапы от аналитического измерения до интегральной оценки метаболического статуса [91, 92].

Ограничения настоящего исследования и направления дальнейших научных разработок. Настоящее исследование имеет ряд ограничений, которые необходимо принимать во внимание при интерпретации полученных результатов.

Прежде всего, размер выборки (52 пациента и 50 участников контрольной группы) является относительно небольшим, что снижает статистическую мощность, особенно при анализе подгрупп: в частности, при сравнении пациентов, получающих и не получающих терапию статинами. Одноцентровый характер набора данных дополнительно ограничивает обобщаемость результатов на более широкие популяции.

Наблюдательный дизайн исследования позволяет оценить особенности профиля ЖК при различных режимах терапии статинами, однако ограничивает возможность установления причинной связи выявленных различий с лекарственным воздействием. Отсутствие повторных измерений не позволяет оценить индивидуальную динамику показателей после начала терапии. Различия в препаратах, дозировках и сопутствующей терапии, а также отсутствие оценки рациона питания могут влиять на результаты сравнений между подгруппами. Отсутствие статистически значимых различий между подгруппами не исключает лекарственного воздействия на исследуемые метаболические звенья.

Дизайн исследования предусматривал отбор пациентов с минимально необходимой фармакотерапией атеросклероза для повышения интерпретируемости изменений в профиле ЖК. Это закономерно ограничивает обобщаемость результатов на популяции, получающие интенсифицированную или комбинированную липидоснижающую терапию (включая высокодозовые режимы статинов с достижением целевых значений ХС ЛПНП по ESC/EAS 2019, а также сочетания с эзетимибом, ингибиторами PCSK9 и препаратами омега-3 ЖК) [7]. Применимость предложенных параметров (ИБ о-6/о-3, C18:0/C18:1n-9, комбинированная логит-модель) в этих популяциях требует отдельной проспективной валидации.

Ввиду умеренного объёма подгрупп «Статин+/Статин−» (n = 40 и n = 12 соответственно) и подгрупп «Статин+ББ/Только статин» (n = 25 и n = 15 соответственно) часть представленных корреляционных оценок имеет ограниченную статистическую мощность. Соответствующие выводы рассматриваются как ориентировочные и подлежат подтверждению на проспективной когорте увеличенного объёма с предварительным расчетом мощности. В первую очередь это относится к выводу об отсутствии модифицирующего влияния β-адреноблокаторов на ассоциации омега-3 статуса с показателями стандартного липидного профиля: данный вывод сделан на основании отсутствия статистически значимых корреляций в подгруппах «Статин+ББ» и «Только статин» и не исключает существования слабого эффекта, не выявляемого в выборке настоящего объёма.

Неравномерное распределение сопутствующего сахарного диабета между группами представляет собой ограничение исследования; вместе с тем, повторный ROC-анализ с исключением пациентов с сахарным диабетом подтвердил сохранение дискриминирующей способности всех ключевых маркеров (Приложение А, таблица А.3), что свидетельствует об устойчивости полученных результатов к влиянию данного фактора.

Разработанные аналитические инструменты (математическая модель оценки омега-3 индекса эритроцитов по данным плазмы, ИБ о-6/о-3 и логит-модель)

прошли лишь внутреннюю валидацию в рамках данной выборки и применительно к конкретной российской популяции. Для подтверждения их устойчивости и воспроизводимости необходима внешняя валидация на более крупных и независимых когортах, в том числе в иных демографических и этнических группах. В целом предложенные подходы следует рассматривать как пилотные разработки, требующие дальнейшего методологического совершенствования.

Наконец, в исследование не были включены клинические конечные точки, такие как ССС, что не позволяет в полной мере оценить клиническую значимость выявленных биохимических ассоциаций.

С учётом указанных ограничений перспективными направлениями дальнейших исследований представляются: проведение проспективных многоцентровых исследований с увеличенным размером выборки; включение детальной оценки рациона питания; рандомизированные сравнения терапевтических подходов; а также проспективная валидация предложенных маркеров для прогнозирования ССР в независимых когортах.

В рамках работы решены пять последовательно связанных задач. Разработана и валидирована методика количественного определения 23 ЖК в плазме, цельной крови и эритроцитах человека в форме аммонийных аддуктов метиловых эфиров методом ВЭЖХ-МС/МС, обеспечивающая разделение *цис*- и *транс*-изомеров C16:1n-7, C18:1n-9 и C18:2n-6 в одном аналитическом цикле при объёме биологической пробы 40 мкл [93]. Создана и валидирована на российской выборке линейная регрессионная модель с логит-преобразованием для пересчёта суммарного плазменного содержания ЭПК и ДГК в расчётный эквивалент эритроцитарного омега-3 индекса. Проведён сравнительный анализ профиля ЖК плазмы у 52 пациентов с гемодинамически значимым стенозирующим атеросклерозом брахиоцефальных артерий и 50 лиц контрольной группы [91]. Оценено влияние терапии аторвастатином и розувастатином на расчетные индексы активности ферментов метаболизма ЖК (SCD1, FADS1 и FADS2, ELOVL2 и ELOVL5). Впервые разработаны ИБ ω-6/ω-3 и комбинированная логит-модель.

Оценена дискриминирующая способность предложенных показателей и соотношения C18:0/C18:1n-9 [92].

Научная новизна работы заключается в комплексном подходе к анализу ЖК, состоящем из аналитического, расчетного и биомаркерного инструментов. Данный подход применим в клинико-фармакологических исследованиях при атеросклерозе на фоне терапии статинами. Впервые для российской популяции валидирована линейная регрессионная модель с логит-преобразованием для пересчёта плазменного содержания ЭПК и ДГК в эквивалент эритроцитарного омега-3 индекса, превосходящая по точности существующие зарубежные регрессионные модели [91]. Впервые предложен и валидирован составной биомаркер ИБ о-6/о-3, интегрирующий соотношения АК и АДК, ЭПК, ДПК и ДГК. Впервые показано, что соотношение C18:0/C18:1n-9 как маркер активности SCD1 сохраняет высокую дискриминирующую способность у пациентов на терапии статинами, в отличие от традиционных показателей омега-3 статуса, АК/ЭПК и омега-6/омега-3, утрачивающих статистическую значимость в этих условиях [92]. Впервые предложена комбинированная логит-модель на основе индексов ЖК, продемонстрировавшая наиболее высокую дискриминирующую способность среди исследованных индексов ЖК при сравнении пациентов с контрольной группой [92].

Теоретическая значимость работы состоит в расширении представлений о плейотропных эффектах статинов, проявляющихся в сдвигах расчетных индексов активности ферментных систем метаболизма ЖК. Работа также обосновывает концепцию профиля ЖК плазмы как интегрального показателя метаболического состояния при атеросклерозе, сохраняющего информативность на фоне терапии статинами.

Полученные данные о различиях между аторвастатином и розувастатином по соотношению ДПК/ДГК, а также о снижении соотношения ЭПК/ДПК, выявленном только в подгруппе аторвастатина, указывают на возможные различия в плейотропных эффектах конкретных представителей класса

ингибиторов ГМГ-КоА-редуктазы и формируют методологическую основу для будущих сравнительных исследований [92].

Практическая значимость работы определяется возможностью применения разработанного подхода к профилированию ЖК в клинико-фармакологических исследованиях. Его основу составляют валидированная аналитическая методика для малого объёма биоматериала, модель пересчёта омега-3 индекса и отдельные показатели, сохраняющие информативность при терапии статинами. Комбинированная логит-модель перспективна для исследования сохраняющихся метаболических сдвигов и ответа на гиполипидемическую терапию [91–93].

Перспективными направлениями дальнейших исследований являются: проспективная валидация предложенных биомаркеров на независимых когортах увеличенного объёма с предварительным расчетом статистической мощности; оценка связи биомаркеров с клиническими исходами в проспективных многоцентровых исследованиях; внешняя валидация комбинированной логистической модели, включая анализ кривых принятия решений (decision curve analysis) и проверку переносимости пороговых значений на иные демографические и этнические группы; применение разработанного инструментария в задачах сравнительной фармакологии гиполипидемических препаратов и в исследованиях комбинированных схем липидоснижающей терапии. Реализация этих направлений будет способствовать дальнейшему развитию персонализированных подходов к ведению пациентов с атеросклерозом, основанных на интегральной оценке метаболизма ЖК.

ВЫВОДЫ

1. Разработана и валидирована оригинальная методика количественного определения 23 ЖК в крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС, обеспечивающая комплексную оценку профиля ЖК крови при изучении плейотропных эффектов статинов. Методика характеризуется высокой чувствительностью и обеспечивает разделение *цис*- и *транс*-изомеров ЖК в едином аналитическом цикле при объёме пробы 40 мкл.

2. Разработана и валидирована на российской выборке модель пересчета суммарного содержания ЭПК и ДГК в плазме крови в расчетный эквивалент эритроцитарного омега-3 индекса. Модель обеспечивает стандартизованную оценку омега-3 статуса и расширяет возможности изучения обеспеченности омега-3 ЖК как предполагаемого условия реализации плейотропных эффектов статинов.

3. Изучение плейотропных эффектов статинов на основе профиля ЖК плазмы крови позволило выделить ферментные звенья SCD1, FADS1, FADS2, ELOVL2 и ELOVL5 для дальнейшей оценки метаболического действия этих препаратов. Основанием послужили выявленные у пациентов с атеросклерозом брахиоцефальных артерий изменения расчётных индексов десатурации и элонгации, снижение доли насыщенных и высоконенасыщенных ЖК, уменьшение суммарной доли ЭПК и ДГК и повышение доли мононенасыщенных ЖК, преимущественно олеиновой кислоты.

4. Терапия аторвастатином ассоциирована с более высоким соотношением ДПК/ДГК по сравнению с терапией розувастатином и сниженным соотношением ЭПК/ДПК относительно контрольной группы, что позволяет предположить различия плейотропных эффектов этих статинов в отношении обмена омега-3 ЖК. При терапии аторвастатином и розувастатином доля АК была статистически значимо ниже контрольной, что согласуется с литературными данными о влиянии статинов на обмен омега-6 ЖК и может отражать их плейотропное действие.

5. Терапия аторвастатином или розувастатином сопровождается сохранением сниженного относительно контрольной группы соотношения

C18:0/C18:1n-9, используемого для косвенной оценки активности SCD1. Значения показателя статистически значимо не различались между подгруппами пациентов, получавших и не получавших статины. Эти результаты позволяют предположить ограниченное влияние исследованных режимов терапии на выраженность данного метаболического отклонения.

6. При исследованных режимах терапии аторвастатином и розувастатином соотношение C18:0/C18:1n-9 и впервые предложенный ИБ ω-6/ω-3 сохраняют статистически значимую дискриминирующую способность при сравнении пациентов с контрольной группой, в отличие от традиционных показателей ЖК – плазменного омега-3 статуса, АК/ЭПК и омега-6/омега-3. Данная способность сохраняется после исключения пациентов с сахарным диабетом. Поэтому соотношение C18:0/C18:1n-9 и ИБ ω-6/ω-3 предлагается рассматривать как показатели метаболических сдвигов, сохраняющихся при исследованных режимах терапии статинами.

7. Комбинированная логит-модель на основе ИБ ω-6/ω-3 и C18:0/C18:1n-9 объединяет показатели различных звеньев метаболизма ЖК, сохраняющие высокую информативность при терапии статинами, и демонстрирует наибольшее из полученных в исследовании значений AUC. Полученные результаты обосновывают перспективность модели для изучения метаболического ответа на терапию и исследования плейотропных эффектов статинов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для характеристики метаболических сдвигов, сохраняющихся при терапии статинами у пациентов с атеросклерозом брахиоцефальных артерий, не достигших целевых значений ХС ЛПНП, целесообразно профилирование ЖК плазмы методом ВЭЖХ-МС/МС с расчётом C18:0/C18:1n-9 и ИБ ω-6/ω-3. Эти показатели сохраняют дискриминирующую способность при исследованных режимах терапии и косвенно характеризуют процессы десатурации и элонгации ЖК. Для интегральной оценки сдвигов в клинико-фармакологических исследованиях предлагается использовать комбинированную логит-модель.

2. Для стандартизованной оценки обеспеченности омега-3 ПНЖК при недоступности определения эритроцитарного омега-3 индекса рекомендуется пересчитывать сумму ЭПК и ДГК плазмы в его расчётный эквивалент по разработанной модели. Это позволяет учитывать омега-3 статус при изучении плейотропных эффектов статинов без анализа эритроцитарной фракции. Предложенный в литературе целевой ориентир эритроцитарного омега-3 индекса – выше 8,0 %, что соответствует омега-3 статусу плазмы выше 5,8 % по разработанной модели.

3. Для оптимизации гиполипидемической терапии предлагается оценивать динамику C18:0/C18:1n-9, ИБ ω-6/ω-3 и омега-3 статуса совместно со стандартным липидным профилем до и после изменения лечения, в том числе при применении комбинаций статинов с препаратами омега-3 ЖК. Динамику индексов следует рассматривать как возможное отражение плейотропных эффектов статинов с учётом питания и сопутствующей терапии. Практическая применимость предложенных подходов требует подтверждения в проспективных клинико-фармакологических исследованиях.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АДК	– адреновая кислота (С22:4n-6)
АК	– арахидоновая кислота (С20:4n-6)
АПФ	– ангиотензинпревращающий фермент
ББ	– бета-адреноблокаторы
БГТ	– бутилгидрокситолуол (2,6-ди-трет-бутил-4-метилфенол)
ВНЖК	– высоконенасыщенные жирные кислоты
ВПКО	– верхний предел количественного определения
ВС	– внутренний стандарт
ВЭЖХ	– высокоэффективная жидкостная хроматография
ВЭЖХ-МС/МС	– высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией
вч-СРБ	– высокочувствительный С-реактивный белок
ГМГ-КоА-редуктаза	– 3-гидрокси-3-метилглутарил-кофермент А-редуктаза
ГХ	– газовая хроматография
ГХ-МС	– газовая хроматография с масс-спектрометрией
ДГК	– докозагексаеновая кислота (С22:6n-3)
ДИ	– доверительный интервал
ДПК	– докозапентаеновая кислота (С22:5n-3)
ЖК	– жирные кислоты
ИБ о-6/о-3	– индекс баланса омега-6/омега-3
КК	– контроль качества
ЛПВП	– липопротеины высокой плотности
ЛПНП	– липопротеины низкой плотности
ЛПОНП	– липопротеины очень низкой плотности
МНЖК	– мононенасыщенные жирные кислоты
мРНК	– матричная рибонуклеиновая кислота

МЭЖК – метиловые эфиры жирных кислот
НЖК – насыщенные жирные кислоты
ННЖК – ненасыщенные жирные кислоты
НПКО – нижний предел количественного определения
ОВР – остаточный воспалительный риск
ОХС – общий холестерин
ПКО – предел количественного определения
ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты
РААС – ренин-ангиотензин-альдостероновая система
СПМ – специализированные проразрешающие медиаторы
ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания
ССР – сердечно-сосудистый риск
ССС – сердечно-сосудистые события
ТГ – триглицериды
ТЖК – *транс*-изомеры жирных кислот
ХС – холестерин
ХС ЛПВП – холестерин ЛПВП
ХС ЛПНП – холестерин ЛПНП
ХС ЛПОНП – холестерин ЛПОНП
ЭПК – эйкозапентаеновая кислота (C20:5n-3)
ЭРИ – электрораспылительная ионизация
ANOVA – дисперсионный анализ
AUC – площадь под ROC-кривой (area under the curve)
DBS – сухие пятна крови
ELOVL1/2/3/5/6 – элонгазы очень длинноцепочечных жирных кислот, изоформы 1/2/3/5/6
EMA – Европейское агентство по лекарственным средствам
FADS1 – десатураза жирных кислот 1 (Δ5-десатураза)
FADS2 – десатураза жирных кислот 2 (Δ6-десатураза)
IL-1β – интерлейкин-1β

IL-6	– интерлейкин-6
LASSO	– метод регуляризации линейных моделей наименьшим абсолютным сжатием
MRM	– мониторинг множественных реакций (multiple reaction monitoring)
PCSK9	– пропротеиновая конвертаза субтилизин-кексинового типа 9
PPAR-α	– рецептор, активируемый пероксисомными пролифераторами, альфа
ROC	– рабочая характеристика приёмника (receiver operating characteristic)
RSD	– относительное стандартное отклонение
SCD1	– стеароил-КоА-десатураза-1
SD	– стандартное отклонение
SE	– стандартная ошибка
SREBP	– стерол-регулирующий элемент-связывающий белок
TNF-α	– фактор некроза опухоли-альфа
TRIPOD	– международный протокол по представлению результатов прогностического моделирования

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Атеросклероз и воспаление – путь от патогенеза к терапии: обзор современного состояния проблемы (часть 2) / А. А. Авагимян, Л. В. Кактурский, О. И. Уразова [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2025. – Т. 24. – № 2. – С. 124-140.

2. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом. 12-й выпуск / И. И. Дедов, М. В. Шестакова, О. Ю. Сухарева [и др.] // Сахарный диабет. – 2025. – Т. 28. – № 5S. – С. 1-175.

3. Изучение липидных и плейотропных эффектов розувастатина у больных острым инфарктом миокарда / Н. А. Джаиани, Е. В. Ильина, А. Г. Кочетов, С. Н. Терещенко // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2008. – Т. 7. – № 7. – С. 91-97.

4. Долгинцев, М. Е. Этиология и патогенез атеросклероза: современные представления и возрастзависимые аспекты (обзор) / М. Е. Долгинцев, А. В. Полоников, И. И. Бобынцев // Научные результаты биомедицинских исследований. – 2025. – Т. 11. – № 2. – С. 330-375.

5. Влияние диеты с высоким содержанием сахарозы на уровни мРНК элонгаз и десатураз и активность этих белков в жировой ткани крысы / Я. Драг, М. Кнапик-Чайка, А. Гаведзка [и др.] // Биохимия. – 2021. – Т. 86. – № 5. – С. 619-628.

6. Драпкина, О. Плейотропные эффекты статинов. Влияние на жесткость сосудов / О. Драпкина, Л. Палаткина, Е. Зятенкова // Врач. – 2012. – Т. 9. – С. 5-8.

7. Нарушения липидного обмена. Клинические рекомендации 2023 / М. В. Ежов, В. В. Кухарчук, И. В. Сергиенко [и др.] // Российский кардиологический журнал. – 2023. – Т. 28, № 5. – С. 5471.

8. Стабильность омега-3 жирных кислот в сухих пятнах крови на стекловолоконных носителях и оценка омега-3 индекса на основе регрессии / Н. Н. Ерощенко, Е. Ю. Данилова, Ж. В. Самсонова [и др.] // БИОМЕДИЦИНА. – 2025. – Т. 21. – № 4. – С. 86-90.

9. Жуков, А. Ю. Омега-3 индекс: современный взгляд и место в клинической практике / А. Ю. Жуков, Л. О. Ворслов, О. В. Давидян // Вопросы диетологии. – 2017. – Т. 7. – № 2. – С. 69-74.

10. Зотов, В. А. Методические аспекты исследования жирных кислот в биологических образцах / В. А. Зотов, В. В. Бессонов, Д. В. Рисник // Прикладная биохимия и микробиология. – 2022. – Т. 58. – № 1. – С. 90-104.

11. Зубарева, М. Ю. Атеросклероз и воспаление: современные терапевтические стратегии / М. Ю. Зубарева, И. В. Сергиенко // Consilium Medicum. – 2024. – Т. 26. – № 1. – С. 31-39.

12. Казакова, М. И. Роль воспаления в патогенезе атеросклероза / М. И. Казакова, Е. А. Высоцкая, Н. П. Митьковская // Неотложная кардиология и кардиоваскулярные риски. – 2022. – Т. 6. – № 2. – С. 1707-1713.

13. Анализ распространенности дефицита омега-3-полиненасыщенных жирных кислот среди жителей разного пола в московском регионе / С. Ю. Калинченко, Л. О. Ворслов, Л. А. Аветисян [и др.] // Вопросы диетологии. – 2018. – Т. 8. – № 2. – С. 10-15.

14. Кобалава, Ж. Д. Терапия статинами и риск развития сахарного диабета / Ж. Д. Кобалава, С. В. Виллевальде // Эффективная фармакотерапия. – 2015. – Т. 11. – С. 26-33.

15. Анализ обзорного липидома плазмы периферической крови при стабильном и нестабильном атеросклерозе брахиоцефальных артерий / А. А. Ломоносова, Д. Г. Гогниева, М. Г. Абдуллаев, А. А. Нартова, А. С. Силантьев, Н. Н. Ерощенко, А. Ю. Суворов, А. И. Новикова, Р. Н. Комаров, А. Н. Дзюндзя, Т. А. Демура, Ф. Ю. Копылов // Российский кардиологический журнал. Сборник тезисов. – 2024. – Т. 29. – № 8S. – С. 115.

16. Обзорные и таргетные липидомные биомаркеры при атеросклеротическом поражении сосудов / А. А. Ломоносова, Д. Г. Гогниева, М. Г. Абдуллаев, А. С. Костикова, Н. Н. Ерощенко, А. А. Нартова, А. С. Силантьев, А. Ю. Суворов, Р. Н. Комаров, А. Н. Дзюндзя, Д. Ю. Щекочихин, Е. А. Сыркина, Ф.

Ю. Копылов // Российский кардиологический журнал. – 2024. – Т. 29. – № 4. – С. 5833.

17. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2024623227 Российская Федерация. База данных показателей таргетного липидомного профилирования плазмы крови у пациентов с атеросклерозом брахиоцефальных артерий и пациентов без атеросклероза брахиоцефальных артерий – база данных : № 2024622629 : заявл. 26.06.2024 : опубл. 19.07.2024 / Ломоносова А. А., Комаров Р. Н., Дзюндзя А. Н., Гогниева Д.Г., Ерощенко Н.Н., Щекочихин Д.Ю., Нартова А.А., Абдуллаев М.Г., Суворов А.Ю., Копылов Ф.Ю. // Федеральная служба по интеллектуальной собственности. – Бюллетень № 7.

18. Лось, Д. А. Структура, регуляция экспрессии и функционирование десатураз жирных кислот / Д. А. Лось // Успехи биологической химии. – 2001. – Т. 41. – С. 163-198.

19. Плейотропные эффекты статинов и резистентность лечения / Г. С. Маль, М. В. Арефина, М. А. Киршанкова, В. Ю. Стягов // Медико-фармацевтический журнал «Пульс». – 2018. – Т. 20. – № 4. – С. 95-98.

20. Насонов, Е. Л. Атеросклероз: перспективы противовоспалительной терапии / Е. Л. Насонов, Т. В. Попкова // Терапевтический архив. – 2018. – Т. 90. – № 5. – С. 4-12.

21. Подзолков, В. И. Роль омега-3 полиненасыщенных жирных кислот в управлении сердечно-сосудистым риском / В. И. Подзолков, М. В. Писарев // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2020. – Т. 19. – № 3. – С. 86-94.

22. Помыткина, Т. Е. Плейотропные эффекты статинов / Т. Е. Помыткина, П. А. Линсцер, Э. А. Драганов // Медицина в Кузбассе. – 2025. – № 2. – С. 5-9.

23. Саргсян, В. Д. Значение омега жирных кислот для профилактики сердечно-сосудистых заболеваний / В. Д. Саргсян, А. С. Сафарян // Профилактическая медицина. – 2021. – Т. 24. – № 7. – С. 90-95.

24. Физиологические аспекты липидного обмена в условиях Арктической зоны Российской Федерации (обзор) / В. А. Соловьева, У. Г. Гусейнова, Н. В.

Соловьева [и др.] // Журнал медико-биологических исследований. – 2024. – № 4. – С. 548-558.

25. Баланс жирных кислот в крови и бляшках у пациентов с каротидным атеросклерозом / А. В. Тарасов, А. Г. Кочетов, Д. М. Галяутдинов [и др.] // Атеросклероз и Дислипидемии. – 2024. – № 1(54). – С. 52-62.

26. Пальмитиновая, олеиновая кислоты и их роль в патогенезе атеросклероза / В. Н. Титов, А. М. Дыгай, М. Ю. Котловский [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2014. – Т. 13. – № 5. – С. 149-159.

27. Титов, В. Н. Клиническая биохимия гиполипидемической терапии и механизмы действия статинов. Жирные кислоты, статины и сахарный диабет / В. Н. Титов // Клиническая лабораторная диагностика. – 2014. – Т. 59. – № 2. – С. 4-15.

28. Фесенко, Э. В. Плейотропные эффекты статинотерапии и их роль в преодолении проблемы полиморбидности / Э. В. Фесенко, К. И. Прощаев, В. И. Поляков // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 2. – С. 48.

29. Хазова, Е. В. Остаточный риск у пациентов с атеросклеротическими кардиоваскулярными заболеваниями / Е. В. Хазова, O. V. Bulashova // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2023. – Т. 22. – № 1. – С. 3382.

30. Шварц, В. Воспаление жировой ткани. Часть 3. Патогенетическая роль в развитии атеросклероза / В. Шварц // Проблемы Эндокринологии. – 2009. – Т. 55. – № 6. – С. 40-45.

31. Ассоциация новых биомаркеров системного воспаления с развитием атеросклероза и его выраженностью / В. А. Шварц, С. М. Талибова, М. А. Сокольская [и др.] // Российский кардиологический журнал. – 2024. – Т. 29. – № 8. – С. 6025.

32. Шевченко, О. П. Атеросклероз как системное воспалительное заболевание с волнообразной и генерализованной активностью процесса / О. П. Шевченко, О. Ф. Природова // Вестник Российского государственного медицинского университета. – 2010. – № 1. – С. 28-33.

33. Исследование ассоциаций жирнокислотного спектра крови с липидным профилем у мужчин г. Новосибирска (ЭССЕ-РФ3 в Новосибирской области) / В. С. Шрамко, Л. В. Щербакова, Г. И. Симонова [и др.] // Атеросклероз и Дислипидемии. – 2024. – № 1(54). – С. 5-14.

34. Abu, E. O. Omega-3 index determined by gas chromatography with electron impact mass spectrometry / E. O. Abu, I. Oluwatowoju // Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids. – 2009. – Vol. 80. – № 4. – P. 189-194.

35. Structural characterization of fatty acids cationized with copper by electrospray ionization mass spectrometry under low-energy collision-induced dissociation / C. Afonso, A. Riu, Y. Xu [et al.] // Journal of Mass Spectrometry. – 2005. – Vol. 40. – № 3. – P. 342-349.

36. Inflammation in atherosclerosis: pathophysiology and mechanisms / A. Ajoolabady, D. Pratico, L. Lin [et al.] // Cell Death & Disease. – 2024. – Vol. 15. – № 11. – P. 817.

37. Polyunsaturated Fatty Acids: Impact on Health and Disease Status / S. Akbar, M. Z. Bhatti, R. F. Saeed, A. S. Qazi // Life and Science. – 2021. – Vol. 2. – № 2. – P. 12.

38. Fatty acid profiling of raw human plasma and whole blood using direct thermal desorption combined with gas chromatography–mass spectrometry / L. Akoto, R. J. J. Vreuls, H. Irth [et al.] // Journal of Chromatography A. – 2008. – Vol. 1186. – № 1–2. – P. 365-371.

39. An omega-3 fatty acid plasma index ≥4 % prevents progression of coronary artery plaque in patients with coronary artery disease on statin treatment / A. Alfaddagh, T. K. Elajami, M. Saleh [et al.] // Atherosclerosis. – 2019. – Vol. 285. – P. 153-162.

40. Inflammation and cardiovascular disease: From mechanisms to therapeutics / A. Alfaddagh, S. S. Martin, T. M. Leucker [et al.] // American Journal of Preventive Cardiology. – 2020. – Vol. 4. – P. 100130.

41. A High-Throughput Method for the Analysis of Erythrocyte Fatty Acids and the Omega-3 Index / A. Alqarni, K. J. Mcintyre, S. H. J. Brown [et al.] // Lipids. – 2018. – Vol. 53. – № 10. – P. 1005-1015.

42. Activity of human Δ5 and Δ6 desaturases on multiple n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids / R. J. de Antueno, L. C. Knickle, H. Smith [et al.] // FEBS Letters. – 2001. – Vol. 509. – № 1. – P. 77-80.

43. Bacaloni, S. Nutrition, Gut Microbiota, and Epigenetics in the Modulation of Immune Response and Metabolic Health / S. Bacaloni, D. K. Agrawal // Cardiology and Cardiovascular Medicine. – 2025. – Vol. 9. – № 3. – P. 111-124.

44. Bäck, M. Omega-3 fatty acids in atherosclerosis and coronary artery disease / M. Bäck // Future Science OA. – 2017. – Vol. 3. – № 4. – P. FSO236.

45. Inflammation and its resolution in atherosclerosis: mediators and therapeutic opportunities / M. Bäck, A. Yurdagul, I. Tabas [et al.] // Nature Reviews Cardiology. – 2019. – Vol. 16. – № 7. – P. 389.

46. Balatskyi, V. V. Role of Stearoyl-CoA Desaturase 1 in Cardiovascular Physiology / V. V. Balatskyi, P. Dobrzyn // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol. 24. – № 6. – P. 5531.

47. Clinical Outcomes with β-Blockers for Myocardial Infarction: A Meta-analysis of Randomized Trials / S. Bangalore, H. Makani, M. Radford [et al.] // The American Journal of Medicine. – 2014. – Vol. 127. – № 10. – P. 939-953.

48. Basil, M. C. Specialized pro-resolving mediators: endogenous regulators of infection and inflammation / M. C. Basil, B. D. Levy // Nature Reviews Immunology. – 2016. – Vol. 16. – № 1. – P. 51-67.

49. FADS1 and FADS2 Gene Polymorphisms Affect Omega-3 and Omega-6 Erythrocyte Fatty Acid Composition and Influence the Association Between Dietary Fatty Acid Intake and Lipid Profile in Brazilian Adults / L. D. Batista, M. M. Rogero, F. M. Sarti [et al.] // Metabolites. – 2025. – Vol. 15. – № 12. – P. 758.

50. Berne, C. Effects of Antihypertensive Treatment on Insulin Sensitivity With Special Reference to ACE Inhibitors / C. Berne, T. Pollare, H. Lithell // Diabetes Care. – 1991. – Vol. 14. – Suppl. 4. – P. 39-47.

51. Berne, C. Comparison of rosuvastatin and atorvastatin for lipid lowering in patients with type 2 diabetes mellitus: results from the URANUS study / C. Berne, A. Siewert-Delle // Cardiovascular Diabetology. – 2005. – Vol. 4. – № 1. – P. 7.

52. Cardiovascular Risk Reduction with Icosapent Ethyl for Hypertriglyceridemia / D. L. Bhatt, P. G. Steg, M. Miller [et al.] // New England Journal of Medicine. – 2019. – Vol. 380. – № 1. – P. 11-22.

53. Bird, J. K. The Role of n-3 Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids in Cardiovascular Disease Prevention, and Interactions with Statins / J. K. Bird, P. C. Calder, M. Eggersdorfer // Nutrients. – 2018. – Vol. 10. – № 6. – P. 775.

54. Bligh, E. G. A rapid method of total lipid extraction and purification / E. G. Bligh, W. J. Dyer // Canadian Journal of Biochemistry and Physiology. – 1959. – Vol. 37. – № 8. – P. 911-917.

55. Block, R. C. Clinical Investigation: Determinants of Blood Cell Omega-3 Fatty Acid Content / R. C. Block, W. S. Harris, J. v. Pottala // The Open Biomarkers Journal. – 2008. – Vol. 1. – № 1. – P. 1-6.

56. De Novo Lipogenesis-Related Monounsaturated Fatty Acids in the Blood Are Associated with Cardiovascular Risk Factors in HFpEF Patients / M. Bock, C. von Schacky, J. Scherr [et al.] // Journal of Clinical Medicine. – 2023. – Vol. 12. – № 15. – P. 4938.

57. Profound reductions in first and total cardiovascular events with icosapent ethyl in the REDUCE-IT trial: why these results usher in a new era in dyslipidaemia therapeutics / W. E. Boden, D. L. Bhatt, P. P. Toth [et al.] // European Heart Journal. – 2020. – Vol. 41. – № 24. – P. 2304-2312.

58. Improved Sensitivity Mass Spectrometric Detection of Eicosanoids by Charge Reversal Derivatization / J. G. Bollinger, W. Thompson, Y. Lai [et al.] // Analytical Chemistry. – 2010. – Vol. 82. – № 16. – P. 6790-6796.

59. LC/ESI-MS/MS detection of FAs by charge reversal derivatization with more than four orders of magnitude improvement in sensitivity / J. G. Bollinger, G. Rohan, M. Sadilek, M. H. Gelb // Journal of Lipid Research. – 2013. – Vol. 54. – № 12. – P. 3523-3530.

60. Fatty Acid Desaturation and Elongation in Mammals / L. M. Bond, M. Miyazaki, L. M. O'Neill [et al.] // Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes. – Elsevier, 2016. – P. 185-208.

61. Effects of a cardioselective β-blocker on postprandial triglyceride-rich lipoproteins, low density lipoprotein particle size and glucose-insulin homeostasis in middle-aged men with modestly increased cardiovascular risk / S. Boquist, G. Ruotolo, M.-L. Hellénius [et al.] // Atherosclerosis. – 1998. – Vol. 137. – № 2. – P. 391-400.

62. Circulating Biomarkers for Laboratory Diagnostics of Atherosclerosis–Literature Review / G. Bordeianu, I. Mitu, R. S. Stanescu [et al.] // Diagnostics. – 2022. – Vol. 12. – № 12. – P. 3141.

63. The CD40-CD40L Dyad as Immunotherapeutic Target in Cardiovascular Disease / L. A. Bosmans, L. Bosch, P. J. H. Kusters [et al.] // Journal of Cardiovascular Translational Research. – 2021. – Vol. 14. – № 1. – P. 13–22.

64. Anti-Inflammatory and Proresolving Effects of the Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acid Adrenic Acid / H. Brouwers, H. S. Jónasdóttir, M. E. Kuipers [et al.] // The Journal of Immunology. – 2020. – Vol. 205. – № 10. – P. 2840–2849.

65. Bucova, M. Inflammation and Genetics of Inflammation in Cardiovascular Diseases / M. Bucova, M. Bucova // Angina Pectoris. – 2011.

66. Plasma fatty acids and risk of colon and rectal cancers in the Singapore Chinese Health Study / L. M. Butler, J.-M. Yuan, J. Y. Huang [et al.] // npj Precision Oncology. – 2017. – Vol. 1. – № 1. – P. 1-10.

67. Calder, P. C. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology? / P. C. Calder // British Journal of Clinical Pharmacology. – 2013. – Vol. 75. – № 3. – P. 645-662.

68. Calder, P. C. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: from molecules to man / P. C. Calder // Biochemical Society Transactions. – 2017. – Vol. 45. – № 5. – P. 1105-1115.

69. Calibration: the Achilles heel of predictive analytics / B. Van Calster, D. J. McLernon, M. van Smeden [et al.] // BMC Medicine. – 2019. – Vol. 17. – № 1. – P. 230.

70. Incorporation and Clearance of Omega-3 Fatty Acids in Erythrocyte Membranes and Plasma Phospholipids / J. Cao, K. A. Schwichtenberg, N. Q. Hanson, M. Y. Tsai // Clinical Chemistry. – 2006. – Vol. 52. – № 12. – P. 2265-2272.

71. Carrapiso, A. I. Development in lipid analysis: Some new extraction techniques and in situ transesterification / A. I. Carrapiso, C. García // Lipids. – 2000. – Vol. 35. – № 11. – P. 1167-1177.

72. Visceral adipose tissue and residual cardiovascular risk: a pathological link and new therapeutic options / A. Cesaro, G. De Michele, F. Fimiani [et al.] // Frontiers in Cardiovascular Medicine. – 2023. – Vol. 10. – P. 1187735.

73. Lipid Geometrical Isomerism: From Chemistry to Biology and Diagnostics / C. Chatgilialoglu, C. Ferreri, M. Melchiorre [et al.] // Chemical Reviews. – 2014. – Vol. 114. – № 1. – P. 255-284.

74. Chen, C. Recent progress in the analysis of unsaturated fatty acids in biological samples by chemical derivatization-based chromatography-mass spectrometry methods / C. Chen, R. Li, H. Wu // Journal of Chromatography B. – 2023. – Vol. 1215. – P. 123572.

75. Chen, J. Characterization of Wax Esters by Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry: Double Bond Effect and Unusual Product Ions / J. Chen, K. B. Green, K. K. Nichols // Lipids. – 2015. – Vol. 50. – № 8. – P. 821-836.

76. Endogenous pro-resolving and anti-inflammatory lipid mediators: The new hope of atherosclerotic diseases / Y. Chen, J. Wang, R. Nie, S. Zhou // Medical Hypotheses. – 2008. – Vol. 71. – № 2. – P. 237-240.

77. Chiang, N. Specialized pro-resolving mediator network: an update on production and actions / N. Chiang, C. N. Serhan // Essays in Biochemistry. – 2020. – Vol. 64. – № 3. – P. 443-462.

78. Interpreting Clinical Trials With Omega-3 Supplements in the Context of Ancestry and FADS Genetic Variation / F. H. Chilton, A. Manichaikul, C. Yang [et al.] // Frontiers in Nutrition. – 2022. – Vol. 8. – P. 808054.

79. Transparent reporting of a multivariable prediction model for individual prognosis or diagnosis (TRIPOD): the TRIPOD Statement / G. S. Collins, J. B. Reitsma, D. G. Altman, K. Moons // BMC Medicine. – 2015. – Vol. 13. – № 1. – P. 1.

80. Polymorphisms in Fatty Acid Desaturase (FADS) Gene Cluster: Effects on Glycemic Controls Following an Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids (PUFA)

Supplementation / H. Cormier, I. Rudkowska, E. Thifault [et al.] // Genes. – 2013. – Vol. 4. – № 3. – P. 485-498.

81. Metabolic indices of polyunsaturated fatty acids: current evidence, research controversies, and clinical utility / S. Davinelli, M. Intrieri, G. Corbi, G. Scapagnini // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. – 2021. – Vol. 61. – № 2. – P. 259-274.

82. Evaluation of highly polar ionic liquid gas chromatographic column for the determination of the fatty acids in milk fat / P. Delmonte, A. R. Fardin-Kia, J. K. G. Kramer [et al.] // Journal of Chromatography A. – 2012. – Vol. 1233. – P. 137-146.

83. DeLong, E. R. Comparing the Areas under Two or More Correlated Receiver Operating Characteristic Curves: A Nonparametric Approach / E. R. DeLong, D. M. DeLong, D. L. Clarke-Pearson // Biometrics. – 1988. – Vol. 44. – № 3. – P. 837.

84. One-Year Effects of Omega-3 Treatment on Fatty Acids, Oxylipins, and Related Bioactive Lipids and Their Associations with Clinical Lipid and Inflammatory Biomarkers: Findings from a Substudy of the Vitamin D and Omega-3 Trial (VITAL) / O. V. Demler, Y. Liu, H. Luttmann-Gibson [et al.] // Metabolites. – 2020. – Vol. 10. – № 11. – P. 1-20.

85. Prediction models for major adverse cardiovascular events after percutaneous coronary intervention: a systematic review / W. Deng, D. Wang, Y. Wan [et al.] // Frontiers in Cardiovascular Medicine. – 2024. – Vol. 10. – P. 1287434.

86. Dennis, E. A. Eicosanoid Storm in Infection and Inflammation / E. A. Dennis, P. C. Norris // Nature Reviews Immunology. – 2015. – Vol. 15. – № 8. – P. 511.

87. DiNicolantonio, J. J. Importance of maintaining a low omega–6/omega–3 ratio for reducing inflammation / J. J. DiNicolantonio, J. H. O'Keefe // Open Heart. – 2018. – Vol. 5. – № 2. – P. e000946.

88. Djuricic, I. Omega-3 (n-3) Fatty Acid–Statin Interaction: Evidence for a Novel Therapeutic Strategy for Atherosclerotic Cardiovascular Disease / I. Djuricic, P. C. Calder // Nutrients. – 2024. – Vol. 16. – № 7. – P. 962.

89. Polyunsaturated fatty acids and fatty acid-derived lipid mediators: Recent advances in the understanding of their biosynthesis, structures, and functions / S. C. Dyall, L. Balas, N. G. Bazan [et al.] // Progress in Lipid Research. – 2022. – Vol. 86. – P. 101165.

90. A rapid GC–MS method for quantification of positional and geometric isomers of fatty acid methyl esters / J. Ecker, M. Scherer, G. Schmitz, G. Liebisch // Journal of Chromatography B. – 2012. – Vol. 897. – P. 98-104.

91. Plasma Fatty Acid Profiling and Mathematical Estimation of the Omega-3 Index: Toward Diagnostic Tools in Atherosclerosis and Statin Therapy Monitoring / N. Eroshchenko, E. Danilova, A. Lomonosova [et al.] // Biomedicines. – 2025. – Vol. 13. – № 6. – P. 1383.

92. Comparative Diagnostic Performance of Conventional and Novel Fatty Acid Indices in Blood Plasma as Biomarkers of Atherosclerosis Under Statin Therapy / N. Eroshchenko, E. Danilova, A. Lomonosova [et al.] // Biomedicines. – 2026. – Vol. 14. – № 1. – P. 149.

93. Development and validation of a HPLC-MS/MS method for the analysis of fatty acids – in the form of FAME ammonium adducts – in human whole blood and erythrocytes to determine omega-3 index / N. N. Eroshchenko, V. V. Veselov, A. V. Pirogov [et al.] // Journal of Chromatography B. – 2023. – Vol. 1227. – P. 123799.

94. European Medicines Agency. Guideline on bioanalytical method validation: EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2 / Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). – London. – 2011. – URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf (дата обращения: 03.09.2021). – Текст : электронный.

95. Evard, H. Tutorial on estimating the limit of detection using LC-MS analysis, part I: Theoretical review / H. Evard, A. Kruve, I. Leito // Analytica Chimica Acta. – 2016. – Vol. 942. – P. 23-39.

96. Fan, J. Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis / J. Fan, T. Watanabe // Journal of Atherosclerosis and Thrombosis. – 2003. – Vol. 10. – № 2. – P. 63-71.

97. Biosynthesis of nervonic acid and perspectives for its production by microalgae and other microorganisms / Y. Fan, H.-M. Meng, G.-R. Hu, F.-L. Li // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2018. – Vol. 102. – № 7. – P. 3027-3035.

98. Farag, M. A. Omega-9 fatty acids: potential roles in inflammation and cancer management / M. A. Farag, M. Z. Gad // Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. – 2022. – Vol. 20. – № 1. – P. 48.

99. Dried blood spots in clinical lipidomics: optimization and recent findings / H. B. Ferreira, I. M. S. Guerra, T. Melo [et al.] // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2022. – Vol. 414. – № 24. – P. 7085-7101.

100. Fluss, R. Estimation of the Youden Index and its Associated Cutoff Point / R. Fluss, D. Faraggi, B. Reiser // Biometrical Journal. – 2005. – Vol. 47. – № 4. – P. 458-472.

101. Folch, J. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues / J. Folch, M. Lees, G. H. S. Stanley // Journal of Biological Chemistry. – 1957. – Vol. 226. – № 1. – P. 497-509.

102. Beneficial effects of rosuvastatin on insulin resistance, adiposity, inflammatory markers and non-alcoholic fatty liver disease in mice fed on a high-fat diet / J. C. Fraulob, V. Souza-Mello, M. B. Aguila, C. A. Mandarim-de-Lacerda // Clinical Science. – 2012. – Vol. 123. – № 4. – P. 259-270.

103. Associations among Dietary Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids, the Gut Microbiota, and Intestinal Immunity / Y. Fu, Y. Wang, H. Gao [et al.] // Mediators of Inflammation. – 2021. – Vol. 2021. – № 1. – P. 8879227.

104. Lipoprotein (a), Inflammation, and Atherosclerosis / S. A. Di Fusco, A. Pietro Maggioni, P. Scicchitano [et al.] // Journal of Clinical Medicine. – 2023. – Vol. 12. – № 7. – P. 2529.

105. Advances in Our Understanding of Oxylipins Derived from Dietary PUFAs / M. Gabbs, S. Leng, J. G. Devassy [et al.] // Advances in Nutrition. – 2015. – Vol. 6. – № 5. – P. 513-540.

106. Statin therapy upregulates arachidonic acid status via enhanced endogenous synthesis in patients with plaque psoriasis / M. S. Garshick, R. Block, K. Drenkova [et al.] // Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids. – 2022. – Vol. 180. – P. 102428.

107. The persistence of low-grade inflammatory monocytes contributes to aggravated atherosclerosis / S. Geng, K. Chen, R. Yuan [et al.] // Nature Communications. – 2016. – Vol. 7. – № 1. – P. 13436.

108. Glaser, C. High-Throughput Analysis of Total Plasma Fatty Acid Composition with Direct In Situ Transesterification / C. Glaser, H. Demmelmair, B. Koletzko // PLoS ONE. – 2010. – Vol. 5. – № 8. – P. e12045.

109. Structure determination of conjugated linoleic and linolenic acids / M. Gong, W. Wei, Y. Hu [et al.] // Journal of Chromatography B. – 2020. – Vol. 1153. – P. 122292.

110. Gonzalez-Riano, C. Exploiting the formation of adducts in mobile phases with ammonium fluoride for the enhancement of annotation in liquid chromatography-high resolution mass spectrometry based lipidomics / C. Gonzalez-Riano, A. Gradillas, C. Barbas // Journal of Chromatography Open. – 2021. – Vol. 1. – P. 100018.

111. Lipid Profile Modulates Cardiometabolic Risk Biomarkers Including Hypertension in People with Type-2 Diabetes: A Focus on Unbalanced Ratio of Plasma Polyunsaturated/Saturated Fatty Acids / I. Gouaref, A. Bouazza, S. A. Abderrhmane, E.-A. Koceir // Molecules. – 2020. – Vol. 25. – № 18. – P. 4315.

112. Diagnostic Potential of the Plasma Lipidome in Infectious Disease: Application to Acute SARS-CoV-2 Infection / N. Gray, N. Lawler, A. Zeng [et al.] // Metabolites. – 2021. – Vol. 11. – № 7. – P. 467.

113. Gregory, M. K. Molecular basis for differential elongation of omega-3 docosapentaenoic acid by the rat Elovl5 and Elovl2 / M. K. Gregory, L. G. Cleland, M. J. James // Journal of Lipid Research. – 2013. – Vol. 54. – № 10. – P. 2851-2857.

114. Grishanova, A. Y. Kynurenic Acid/AhR Signaling at the Junction of Inflammation and Cardiovascular Diseases / A. Y. Grishanova, M. L. Perepechaeva // International Journal of Molecular Sciences. – 2024. – Vol. 25. – № 13. – P. 6933.

115. The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice / H. Guillou, D. Zadravec, P. G. P. Martin, A. Jacobsson // Progress in Lipid Research. – 2010. – Vol. 49. – № 2. – P. 186-199.

116. Gusev, E. Atherosclerosis and Inflammation: Insights from the Theory of General Pathological Processes / E. Gusev, A. Sarapultsev // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol. 24. – № 9. – P. 7910.

117. Derivation of the Omega-3 Index from EPA and DHA Analysis of Dried Blood Spots from Dogs and Cats / W. S. Harris, K. H. Jackson, H. Carlson [et al.] // Veterinary Sciences. – 2022. – Vol. 10. – № 1. – P. 13.

118. Harris, W. S. The omega-3 index as a risk factor for coronary heart disease / W. S. Harris // The American Journal of Clinical Nutrition. – 2008. – Vol. 87. – № 6. – P. 1997S-2002S.

119. Red Blood Cell Fatty Acids and Incident Diabetes Mellitus in the Women's Health Initiative Memory Study / W. S. Harris, J. Luo, J. V. Pottala [et al.] // PLOS ONE. – 2016. – Vol. 11. – № 2. – P. e0147894.

120. Harris, W. S. Recent studies confirm the utility of the omega-3 index / W. S. Harris // Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care. – 2025. – Vol. 28. – № 2. – P. 91-95.

121. Harris, W. S. Measurement of the Omega-3 Index in Dried Blood Spots / W. S. Harris, J. Polreis // Annals of Clinical and Laboratory Research. – 2016. – Vol. 4. – № 4. – P. 4.

122. Harris, W. S. The Omega-3 Index: a new risk factor for death from coronary heart disease? / W. S. Harris, C. von Schacky // Preventive Medicine. – 2004. – Vol. 39. – № 1. – P. 212-220.

123. Short-Term Effects of Beta Blockers Atenolol, Nadolol, Pindolol, and Propranolol on Lipoprotein Metabolism in Normolipemic Subjects / C. Harvengt, F. R. Heller, Ph. Martial, Y. VAN Nieuwenhuyze // The Journal of Clinical Pharmacology. – 1987. – Vol. 27. – № 7. – P. 475-480.

124. A validated method for analyzing polyunsaturated free fatty acids from dried blood spots using LC–MS/MS / E. Hewawasam, G. Liu, D. W. Jeffery [et al.] // Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids. – 2017. – Vol. 125. – P. 1-7.

125. Hoang, T. Comparative Effect of Statins and Omega-3 Supplementation on Cardiovascular Events: Meta-Analysis and Network Meta-Analysis of 63 Randomized

Controlled Trials Including 264,516 Participants / T. Hoang, J. Kim // Nutrients. – 2020. – Vol. 12. – № 8. – P. 2218.

126. Hsu, F. F. Distinction among isomeric unsaturated fatty acids as lithiated adducts by electrospray ionization mass spectrometry using low energy collisionally activated dissociation on a triple stage quadrupole instrument / F. F. Hsu, J. Turk // Journal of the American Society for Mass Spectrometry. – 1999. – Vol. 10. – № 7. – P. 600-612.

127. Conversion ratios of n-3 fatty acids between plasma and erythrocytes: a systematic review and meta-regression / X. F. Hu, S. K. Sandhu, W. S. Harris, H. M. Chan // British Journal of Nutrition. – 2017. – Vol. 117. – № 8. – P. 1162-1173.

128. SREBP1 induction mediates long-term statins therapy related myocardial lipid peroxidation and lipid deposition in TIIDM mice / T. sheng Huang, T. Wu, X. lu Fu [et al.] // Redox Biology. – 2024. – Vol. 78. – P. 103412.

129. Continuous Age-Dependent Reference Ranges for Thyroid Hormones in Neonates, Infants, Children and Adolescents Established Using the ADVIA(r) Centaur(tm) Analyzer / U. Hübner, C. Englisch, H. Werkmann [et al.] // Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. – 2002. – Vol. 40. – № 10. – P. 1040-1047.

130. Hwang, D. H. Mechanisms for the activation of Toll-like receptor 2/4 by saturated fatty acids and inhibition by docosahexaenoic acid / D. H. Hwang, J.-A. Kim, J. Y. Lee // European Journal of Pharmacology. – 2016. – Vol. 785. – P. 24-35.

131. Innes, J. K. Omega-6 fatty acids and inflammation / J. K. Innes, P. C. Calder // Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids. – 2018. – Vol. 132. – P. 41-48.

132. Assessing the Efficacy of Omega-3 Fatty Acids + Statins vs. Statins Only on Cardiovascular Outcomes: A Systematic Review and Meta-Analysis of 40,991 Patients / A. Irfan, S. H. Haider, A. Nasir [et al.] // Current Problems in Cardiology. – 2024. – Vol. 49. – № 2. – P. 102245.

133. Long-chain polyunsaturated fatty acid (LC-PUFA) status in severe preeclampsia and preterm birth: a cross sectional study / R. Irwinda, R. Hiksas, A. A. Siregar [et al.] // Scientific Reports. – 2021. – Vol. 11. – № 1. – P. 14701.

134. Atorvastatin increases Fads1, Fads2 and Elovl5 gene expression via the geranylgeranyl pyrophosphate-dependent Rho kinase pathway in 3T3-L1 cells / N.

Ishihara, S. Suzuki, S. Tanaka [et al.] // Molecular Medicine Reports. – 2017. – Vol. 16. – № 4. – P. 4756-4762.

135. Relationships between plasma fatty acid composition and coronary artery disease / H. Itakura, M. Yokoyama, M. Matsuzaki [et al.] // Journal of Atherosclerosis and Thrombosis. – 2011. – Vol. 18. – № 2. – P. 99-107.

136. Beneficial effects of linoleic acid on cardiometabolic health: an update / K. H. Jackson, W. S. Harris, M. A. Belury [et al.] // Lipids in Health and Disease. – 2024. – Vol. 23. – № 1. – P. 296.

137. The Role of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Their Lipid Mediators on Skeletal Muscle Regeneration: A Narrative Review / S. Jannas-Vela, A. Espinosa, A. A. Candia [et al.] // Nutrients. – 2023. – Vol. 15. – № 4. – P. 871.

138. Fatty Acid Profile of Mature Red Blood Cell Membranes and Dietary Intake as a New Approach to Characterize Children with Overweight and Obesity / I. Jauregibeitia, K. Portune, I. Rica [et al.] // Nutrients. – 2020. – Vol. 12. – № 11. – P. 3446.

139. Potential of Erythrocyte Membrane Lipid Profile as a Novel Inflammatory Biomarker to Distinguish Metabolically Healthy Obesity in Children / I. Jauregibeitia, K. Portune, I. Rica [et al.] // Journal of Personalized Medicine. – 2021. – Vol. 11. – № 5. – P. 337.

140. Jenkins, B. A Review of Odd-Chain Fatty Acid Metabolism and the Role of Pentadecanoic Acid (C15:0) and Heptadecanoic Acid (C17:0) in Health and Disease / B. Jenkins, J. A. West, A. Koulman // Molecules. – 2015. – Vol. 20. – № 2. – P. 2425-2444.

141. Jump, D. B. The Biochemistry of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids / D. B. Jump // Journal of Biological Chemistry. – 2002. – Vol. 277. – № 11. – P. 8755-8758.

142. Efficacy and Safety of Omega-3 Fatty Acids in Patients Treated with Statins for Residual Hypertriglyceridemia: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial / J. E. Jun, I.-K. Jeong, J. M. Yu [et al.] // Diabetes & Metabolism Journal. – 2020. – Vol. 44. – № 1. – P. 78.

143. Residual inflammatory risk and the impact on clinical outcomes in patients after percutaneous coronary interventions / D. N. Kalkman, M. Aquino, B. E. Claessen [et al.] // European Heart Journal. – 2018. – Vol. 39. – № 46. – P. 4101-4108.

144. Serum Free Fatty Acid Changes Caused by High Expression of Stearoyl-CoA Desaturase 1 in Tumor Tissues Are Early Diagnostic Markers for Ovarian Cancer / K. Katoh, Y. Katoh, A. Kubo [et al.] // Cancer Research Communications. – 2023. – Vol. 3. – № 9. – P. 1840-1852.

145. Basal omega-3 fatty acid status affects fatty acid and oxylipin responses to high-dose n3-HUFA in healthy volunteers / A. H. Keenan, T. L. Pedersen, K. Fillaus [et al.] // Journal of Lipid Research. – 2012. – Vol. 53. – № 8. – P. 1662-1669.

146. Kelishadi, R. Inflammation-induced atherosclerosis as a target for prevention of cardiovascular diseases from early life / R. Kelishadi // The Open Cardiovascular Medicine Journal. – 2010. – Vol. 4. – № 2. – P. 24-29.

147. Anti-Inflammatory Diet Prevents Subclinical Colonic Inflammation and Alters Metabolomic Profile of Ulcerative Colitis Patients in Clinical Remission / A. H. Keshteli, R. Valcheva, C. Nickurak [et al.] // Nutrients. – 2022. – Vol. 14. – № 16. – P. 3294.

148. Plasma Phospholipid Fatty Acid Concentration and Incident Coronary Heart Disease in Men and Women: The EPIC-Norfolk Prospective Study / K.-T. Khaw, M. D. Friesen, E. Riboli [et al.] // PLoS Medicine. – 2012. – Vol. 9. – № 7. – P. e1001255.

149. Kihara, A. Very long-chain fatty acids: elongation, physiology and related disorders / A. Kihara // Journal of Biochemistry. – 2012. – Vol. 152. – № 5. – P. 387-395.

150. Kim, S. R. The association of cardiovascular risk factors with saturated fatty acids and fatty acid desaturase indices in erythrocyte in middle-aged Korean adults / S. R. Kim, S. Y. Jeon, S.-M. Lee // Lipids in Health and Disease. – 2015. – Vol. 14. – № 1. – P. 133.

151. Quantitation of total fatty acids in plasma and serum by GC-NCI-MS / E. Kish-Trier, E. L. Schwarz, M. Pasquali, T. Yuzyuk // Clinical Mass Spectrometry. – 2016. – Vol. 2. – P. 11-17.

152. Kotlyarov, S. Involvement of Fatty Acids and Their Metabolites in the Development of Inflammation in Atherosclerosis / S. Kotlyarov, A. Kotlyarova // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 23. – № 3. – P. 1308.

153. Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease – a review. Part 2: fatty acid physiological roles and applications in human health and disease / L.-S. Kremmyda, E. Tvrzicka, B. Stankova, A. Zak // Biomedical Papers. – 2011. – Vol. 155. – № 3. – P. 195-218.

154. Kris-Etherton, P. M. Fish Consumption, Fish Oil, Omega-3 Fatty Acids, and Cardiovascular Disease / P. M. Kris-Etherton, W. S. Harris, L. J. Appel // Circulation. – 2002. – Vol. 106. – № 21. – P. 2747-2757.

155. Statin induction of liver fatty acid-binding protein (L-FABP) gene expression is peroxisome proliferator-activated receptor-α-dependent / J. F. Landrier, C. Thomas, J. Grober [et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 2004. – Vol. 279. – № 44. – P. 45512-45518.

156. Lee, D. K. Data transformation: a focus on the interpretation / D. K. Lee // Korean Journal of Anesthesiology. – 2020. – Vol. 73. – № 6. – P. 503-508.

157. Lee, H. Unsaturated Fatty Acids, Desaturases, and Human Health / H. Lee, W. J. Park // Journal of Medicinal Food. – 2014. – Vol. 17. – № 2. – P. 189-197.

158. Simultaneous profiling of polar lipids by supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry with methylation / J. W. Lee, S. Nishiumi, M. Yoshida [et al.] // Journal of Chromatography A. – 2013. – Vol. 1279. – P. 98-107.

159. Beneficial Effects of Omega-3 Fatty Acids on Low Density Lipoprotein Particle Size in Patients with Type 2 Diabetes Already under Statin Therapy / M. W. Lee, J. K. Park, J. W. Hong [et al.] // Diabetes & Metabolism Journal. – 2013. – Vol. 37. – № 3. – P. 207.

160. Serial Biomarkers of De Novo Lipogenesis Fatty Acids and Incident Heart Failure in Older Adults: The Cardiovascular Health Study / Y. Lee, H. T. M. Lai, M. C. de Oliveira Otto [et al.] // Journal of the American Heart Association. – 2020. – Vol. 9. – № 4. – P. e014119.

161. Lehtonen, A. Effect of beta blockers on blood lipid profile / A. Lehtonen // American Heart Journal. – 1985. – Vol. 109. – № 5. – P. 1192-1196.

162. Global Surveillance of trans-Fatty Acids / C. Li, L. K. Cobb, H. W. Vesper, S. Asma // Preventing Chronic Disease. – 2019. – Vol. 16. – № 10. – P. 190121.

163. Development and validation of a logistic regression model for the diagnosis of colorectal cancer / C. Li, W. Zhang, Q. Chen [et al.] // Scientific Reports. – 2025. – Vol. 15. – № 1. – P. 14759.

164. Li, X. Improved LC−MS Method for the Determination of Fatty Acids in Red Blood Cells by LC−Orbitrap MS / X. Li, A. A. Franke // Analytical Chemistry. – 2011. – Vol. 83. – № 8. – P. 3192-3198.

165. Associations of ω-3, ω-6 polyunsaturated fatty acids intake and ω-6: ω-3 ratio with systemic immune and inflammatory biomarkers : NHANES 1999–2020 / Y. Li, H. Tang, X. Yang [et al.] // Frontiers in Nutrition. – 2024. – Vol. 11. – P. 1410154.

166. Liao, J. K. Pleiotropic effects of statins / J. K. Liao, U. Laufs // Annual Review of Pharmacology and Toxicology. – 2005. – Vol. 45. – № 1. – P. 89-118.

167. Libby, P. The changing landscape of atherosclerosis / P. Libby // Nature. – 2021. – Vol. 592. – № 7855. – P. 524-533.

168. Liu, G. A method for long term stabilisation of long chain polyunsaturated fatty acids in dried blood spots and its clinical application / G. Liu, B. S. Mühlhäusler, R. A. Gibson // Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids. – 2014. – Vol. 91. – № 6. – P. 251-260.

169. The Blood Plasma Lipidomic Profile in Atherosclerosis of the Brachiocephalic Arteries / A. Lomonosova, D. Gognieva, A. Suvorov, A. Silantyev, A. Abasheva, Y. Vasina, M. Abdullaev, A. Nartova, N. Eroshchenko, V. Kazakova, R. Komarov, A. Dzyundzya, E. Danilova, D. Shchekochikhin, P. Kopylov // Biomedicines. – 2024. – Vol. 12. – № 6. – P. 1279.

170. Pro-resolving mediators produced from EPA and DHA: Overview of the pathways involved and their mechanisms in metabolic syndrome and related liver diseases / C. López-Vicario, B. Rius, J. Alcaraz-Quiles [et al.] // European Journal of Pharmacology. – 2016. – Vol. 785. – P. 133-143.

171. Contribution of vascular cell-derived cytokines to innate and inflammatory pathways in atherogenesis / H. Loppnow, M. Buerke, K. Werdan, S. Rose-John // Journal of Cellular and Molecular Medicine. – 2011. – Vol. 15. – № 3. – P. 484-500.

172. Oleate activates SREBP-1 signaling activity in SCD1-deficient hepatocytes / M. A. Lounis, K.-F. Bergeron, M. S. Burhans [et al.] // American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. – 2017. – Vol. 313. – № 6. – P. E710-E720.

173. Luo, C. Is Omega-3 Index necessary for fish oil supplements for CVD risk prevention? / C. Luo, Z. Chen // Cardiology Plus. – 2022. – Vol. 7. – № 2. – P. 70-76.

174. Luo, J. Lowering low-density lipoprotein cholesterol: from mechanisms to therapies / J. Luo, J.-K. Wang, B.-L. Song // Life Metabolism. – 2022. – Vol. 1. – № 1. – P. 25-38.

175. Altered Indices of Fatty Acid Elongases ELOVL6, ELOVL5, and ELOVL2 Activities in Patients with Impaired Fasting Glycemia / J. Macášek, M. Zeman, A. Žák [et al.] // Metabolic Syndrome and Related Disorders. – 2021. – Vol. 19. – № 7. – P. 386-392.

176. ω-6 Polyunsaturated Fatty Acids and Cardiometabolic Health: Current Evidence, Controversies, and Research Gaps / K. C. Maki, F. Eren, M. E. Cassens [et al.] // Advances in Nutrition. – 2018. – Vol. 9. – № 6. – P. 688-700.

177. Malaviya, A. N. Prevention of Atherosclerotic Cardiovascular Disease in Rheumatoid Arthritis: Persistent Low-grade In-flammation May be an Impediment Needing Attention / A. N. Malaviya, B. Bondge, S. Prasad // Indian Journal of Rheumatology. – 2024. – Vol. 19. – № 2. – P. 130-135.

178. Mantzourani, C. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS) Derivatization-Based Methods for the Determination of Fatty Acids in Biological Samples / C. Mantzourani, M. G. Kokotou // Molecules. – 2022. – Vol. 27. – № 17. – P. 5717.

179. Mariamenatu, A. H. Overconsumption of Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids (PUFAs) versus Deficiency of Omega-3 PUFAs in Modern-Day Diets: The Disturbing Factor for Their “Balanced Antagonistic Metabolic Functions” in the Human Body / A. H. Mariamenatu, E. M. Abdu // Journal of Lipids. – 2021. – Vol. 2021. – P. 1-15.

180. FADS genotypes and desaturase activity estimated by the ratio of arachidonic acid to linoleic acid are associated with inflammation and coronary artery disease / N.

Martinelli, D. Girelli, G. Malerba [et al.] // The American Journal of Clinical Nutrition. – 2008. – Vol. 88. – № 4. – P. 941-949.

181. Masood, M. A. LC-MS-sMRM method development and validation of different classes of pain panel drugs and analysis of clinical urine samples / M. A. Masood, T. D. Veenstra // Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology. – 2020. – Vol. 127. – № 6. – P. 533-550.

182. Stearoyl-CoA Desaturase-1 (SCD1) Augments Saturated Fatty Acid-Induced Lipid Accumulation and Inhibits Apoptosis in Cardiac Myocytes / H. Matsui, T. Yokoyama, K. Sekiguchi [et al.] // PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7. – № 3. – P. e33283.

183. Plasma Phospholipid Fatty Acid Biomarkers of Dietary Fat Quality and Endogenous Metabolism Predict Coronary Heart Disease Risk: A Nested Case-Control Study Within the Women's Health Initiative Observational Study / N. R. Matthan, E. M. Ooi, L. Van Horn [et al.] // Journal of the American Heart Association. – 2014. – Vol. 3. – № 4. – P. e000764.

184. The relationship of plasma Trans fatty acids with dietary inflammatory index among US adults / M. Mazidi, H. Gao, N. Shivappa [et al.] // Lipids in Health and Disease. – 2017. – Vol. 16. – № 1. – P. 147.

185. Menotti, A. Dietary Fatty Acids Predicting Long Term Cardiovascular Mortality in a Cohort of Middle-Aged Men Followed-Up until Extinction / A. Menotti, P. E. Puddu // Hearts. – 2024. – Vol. 5. – № 2. – P. 196-210.

186. Menotti, A. Ancel Keys, the Mediterranean Diet, and the Seven Countries Study: A Review / A. Menotti, P. E. Puddu // Journal of Cardiovascular Development and Disease. – 2025. – Vol. 12. – № 4. – P. 141.

187. Metcalfe, L. D. The Rapid Preparation of Fatty Acid Esters for Gas Chromatographic Analysis / L. D. Metcalfe, A. A. Schmitz // Analytical Chemistry. – 1961. – Vol. 33. – № 3. – P. 363-364.

188. Butylated hydroxytoluene can protect polyunsaturated fatty acids in dried blood spots from degradation for up to 8 weeks at room temperature / A. H. Metherel, R. C. Hogg, L. M. Buzikievich, K. D. Stark // Lipids in Health and Disease. – 2013. – Vol. 12. – № 1. – P. 1-10.

189. Metherel, A. H. Updates to the n-3 polyunsaturated fatty acid biosynthesis pathway: DHA synthesis rates, tetracosahexaenoic acid and (minimal) retroconversion / A. H. Metherel, R. P. Bazinet // Progress in Lipid Research. – 2019. – Vol. 76. – P. 101008.

190. Mjøs, S. A. Identification of fatty acids in gas chromatography by application of different temperature and pressure programs on a single capillary column / S. A. Mjøs // Journal of Chromatography A. – 2003. – Vol. 1015. – № 1–2. – P. 151-161.

191. A rapid and sensitive profiling of free fatty acids using liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC/ESI-MS/MS) after chemical derivatization / H. J. Mok, J. W. Lee, R. Bandu [et al.] // RSC Advances. – 2016. – Vol. 6. – № 38. – P. 32130-32139.

192. Moon, Y.-A. Deletion of ELOVL5 leads to fatty liver through activation of SREBP-1c in mice / Y.-A. Moon, R. E. Hammer, J. D. Horton // Journal of Lipid Research. – 2009. – Vol. 50. – № 3. – P. 412-423.

193. Resolvins and omega three polyunsaturated fatty acids: Clinical implications in inflammatory diseases and cancer / K. Moro, M. Nagahashi, R. Ramanathan [et al.] // World Journal of Clinical Cases. – 2016. – Vol. 4. – № 7. – P. 155.

194. Morrison, W. R. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride–methanol / W. R. Morrison, L. M. Smith // Journal of Lipid Research. – 1964. – Vol. 5. – № 4. – P. 600-608.

195. Trans Fatty Acids and Cardiovascular Disease / D. Mozaffarian, M. B. Katan, A. Ascherio [et al.] // New England Journal of Medicine. – 2006. – Vol. 354. – № 15. – P. 1601-1613.

196. Mozaffarian, D. Omega-3 Fatty Acids and Cardiovascular Disease: Effects on Risk Factors, Molecular Pathways, and Clinical Events / D. Mozaffarian, J. H. Y. Wu // Journal of the American College of Cardiology. – 2011. – Vol. 58. – № 20. – P. 2047-2067.

197. Lower estimates of δ-5 desaturase and elongase activity are related to adverse profiles for several metabolic risk factors in young Japanese women / K. Murakami, S.

Sasaki, Y. Takahashi [et al.] // Nutrition Research. – 2008. – Vol. 28. – № 12. – P. 816-824.

198. Mustonen, A. M. Dihomo-γ-Linolenic Acid (20:3n-6)–Metabolism, Derivatives, and Potential Significance in Chronic Inflammation / A. M. Mustonen, P. Nieminen // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol. 24. – № 3. – P. 2116.

199. Nakamura, M. T. Structure, function, and dietary regulation of delta6, delta5, and delta9 desaturases / M. T. Nakamura, T. Y. Nara // Annual Review of Nutrition. – 2004. – Vol. 24. – № 1. – P. 345-376.

200. Effect of statin add-on therapy on cardiovascular mortality / J. R. Nelson, V. Le, J. L. Anderson, N. Ciffone // Frontiers in Cardiovascular Medicine. – 2024. – Vol. 11. – P. 1308695.

201. Nelson, J. R. The eicosapentaenoic acid:arachidonic acid ratio and its clinical utility in cardiovascular disease / J. R. Nelson, S. Raskin // Postgraduate Medicine. – 2019. – Vol. 131. – № 4. – P. 268-277.

202. Colchicine in Patients with Chronic Coronary Disease / S. M. Nidorf, A. T. L. Fiolet, A. Mosterd [et al.] // The New England Journal of Medicine. – 2020. – Vol. 383. – № 19. – P. 1838-1847.

203. Hydroxymethylglutaryl Coenzyme a Reductase Inhibitors Differentially Modulate Plasma Fatty Acids in Rats With Diet-Induced-Hyperhomocysteinemia: Is ω-3 Fatty Acids Supplementation Necessary? / T. Nikolic Turnic, A. Arsic, V. Vucic [et al.] // Frontiers in Physiology. – 2019. – Vol. 10. – P. 892.

204. Association between ratio of serum eicosapentaenoic acid to arachidonic acid and risk of cardiovascular disease: The Hisayama Study / T. Ninomiya, M. Nagata, J. Hata [et al.] // Atherosclerosis. – 2013. – Vol. 231. – № 2. – P. 261-267.

205. Effects of Statins on Serum n-3 to n-6 Polyunsaturated Fatty Acid Ratios in Patients With Coronary Artery Disease / T. Nozue, S. Yamamoto, S. Tohyama [et al.] // Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics. – 2013. – Vol. 18. – № 4. – P. 320-326.

206. Nozue, T. Statin treatment alters serum n-3 to n-6 polyunsaturated fatty acids ratio in patients with dyslipidemia / T. Nozue, I. Michishita // Lipids in Health and Disease. – 2015. – Vol. 14. – № 1. – P. 67.

207. Two alternative pathways for docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3) biosynthesis are widespread among teleost fish / A. Oboh, N. Kabeya, G. Carmona-Antoñanzas [et al.] // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7. – № 1. – P. 3889.

208. Oesterle, A. Pleiotropic Effects of Statins on the Cardiovascular System / A. Oesterle, U. Laufs, J. K. Liao // Circulation Research. – 2017. – Vol. 120. – № 1. – P. 229-243.

209. A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: Application to wet meat tissues, oils, and feedstuffs / J. V. O'Fallon, J. R. Busboom, M. L. Nelson, C. T. Gaskins // Journal of Animal Science. – 2007. – Vol. 85. – № 6. – P. 1511-1521.

210. The Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties of n-3 PUFAs: Their Role in Cardiovascular Protection / F. Oppedisano, R. Macrì, M. Gliozzi [et al.] // Biomedicines. – 2020. – Vol. 8. – № 9. – P. 306.

211. Statins Increase Mitochondrial and Peroxisomal Fatty Acid Oxidation in the Liver and Prevent Non-Alcoholic Steatohepatitis in Mice / H.-S. Park, J. E. Jang, M. S. Ko [et al.] // Diabetes & Metabolism Journal. – 2016. – Vol. 40. – № 5. – P. 376.

212. Paton, C. M. Biochemical and physiological function of stearoyl-CoA desaturase / C. M. Paton, J. M. Ntambi // American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. – 2009. – Vol. 297. – № 1. – P. E28-E37.

213. Health Implications of High Dietary Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids / E. Patterson, R. Wall, G. F. Fitzgerald [et al.] // Journal of Nutrition and Metabolism. – 2012. – Vol. 2012. – № 1. – P. 1-16.

214. Residual inflammatory risk in coronary heart disease: incidence of elevated high-sensitive CRP in a real-world cohort / A. Peikert, K. Kaier, J. Merz [et al.] // Clinical Research in Cardiology. – 2020. – Vol. 109. – № 3. – P. 315-323.

215. Competitive season effects on polyunsaturated fatty acid content in erythrocyte membranes of female football players / N. Peña, J. Amézaga, G. Marrugat [et

al.] // Journal of the International Society of Sports Nutrition. – 2023. – Vol. 20. – № 1. – P. 2245386.

216. Pereira, B. Targeting Inflammation and Immunosenescence to Improve Vaccine Responses in the Elderly / B. Pereira, X. N. Xu, A. N. Akbar // Frontiers in Immunology. – 2020. – Vol. 11. – P. 583019.

217. Role of Oleic Acid in the Gut-Liver Axis: From Diet to the Regulation of Its Synthesis via Stearoyl-CoA Desaturase 1 (SCD1) / E. Piccinin, M. Cariello, S. De Santis [et al.] // Nutrients. – 2019. – Vol. 11. – № 10. – P. 2283.

218. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry for fatty acid ethyl esters in meconium: Assessment of prenatal exposure to alcohol in two European cohorts / S. Pichini, M. Pellegrini, J. Gareri [et al.] // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2008. – Vol. 48. – № 3. – P. 927-933.

219. The Diabetes Mellitus–Atherosclerosis Connection: The Role of Lipid and Glucose Metabolism and Chronic Inflammation / A. Poznyak, A. V. Grechko, P. Poggio [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – Vol. 21. – № 5. – P. 1835.

220. Quehenberger, O. High sensitivity quantitative lipidomics analysis of fatty acids in biological samples by gas chromatography-mass spectrometry / O. Quehenberger, A. M. Armando, E. A. Dennis // Biochimica et Biophysica Acta – Molecular and Cell Biology of Lipids. – 2011. – Vol. 1811. – № 11. – P. 648-656.

221. Effects of statins on specialized pro-resolving mediators: An additional pathway leading to resolution of inflammation / S. Radbakhsh, N. Katsiki, R. D. Santos [et al.] // Metabolism. – 2022. – Vol. 132. – P. 155211.

222. Inflammation-Driven Plaque Erosion in Atherosclerosis: A Focus on Complement System Pathways / D. Ramoni, F. Carbone, S. Kraler [et al.] // Current Atherosclerosis Reports. – 2025. – Vol. 27. – № 1. – P. 42.

223. Age and Age-Related Diseases: Role of Inflammation Triggers and Cytokines / I. M. Rea, D. S. Gibson, V. McGilligan [et al.] // Frontiers in Immunology. – 2018. – Vol. 9. – № APR. – P. 334076.

224. Total Serum Fatty Acid Analysis by GC-MS: Assay Validation and Serum Sample Stability / J. Ren, E. Mozurkewich, A. Sen [et al.] // Current Pharmaceutical Analysis. – 2013. – Vol. 9. – № 4. – P. 331-339.

225. Ridker, P. M. From C-Reactive Protein to Interleukin-6 to Interleukin-1 / P. M. Ridker // Circulation Research. – 2016. – Vol. 118. – № 1. – P. 145-156.

226. Ridker, P. M. Residual inflammatory risk: addressing the obverse side of the atherosclerosis prevention coin / P. M. Ridker // European Heart Journal. – 2016. – Vol. 37. – № 22. – P. 1720-1722.

227. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease / P. M. Ridker, B. M. Everett, T. Thuren [et al.] // New England Journal of Medicine. – 2017. – Vol. 377. – № 12. – P. 1119-1131.

228. Trained immunity in atherosclerotic cardiovascular disease / N. P. Riksen, S. Bekkering, W. J. M. Mulder, M. G. Netea // Nature Reviews Cardiology. – 2023. – Vol. 20. – № 12. – P. 799-811.

229. Calculating the sample size required for developing a clinical prediction model / R. D. Riley, J. Ensor, K. I. E. Snell [et al.] // BMJ. – 2020. – Vol. 368. – P. m441.

230. Statins enhance arachidonic acid synthesis in hypercholesterolemic patients / P. Risé, F. Pazzucconi, C. R. Sirtori, C. Galli // Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases. – 2001. – Vol. 11. – № 2. – P. 88-94.

231. Δ5 desaturase mRNA levels are increased by simvastatin via SREBP-1 at early stages, not via PPARα, in THP-1 cells / P. Risé, S. Ghezzi, R. Carissimi [et al.] // European Journal of Pharmacology. – 2007. – Vol. 571. – № 2–3. – P. 97-105.

232. Coexisting role of fasting or feeding and dietary lipids in the control of gene expression of enzymes involved in the synthesis of saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids / M. Rodríguez-Cruz, R. Sánchez González, A. M. Sánchez García, M. Lòpez-Alarcòn // Gene. – 2012. – Vol. 496. – № 1. – P. 28-36.

233. Atorvastatin Treatment Induced Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α Expression and Decreased Plasma Nonesterified Fatty Acids and Liver Triglyceride in Fructose-Fed Rats / N. Roglans, E. Sanguino, C. Peris [et al.] // The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. – 2002. – Vol. 302. – № 1. – P. 232-239.

234. Expression of SREBP-1c Requires SREBP-2-mediated Generation of a Sterol Ligand for LXR in Livers of Mice / S. Rong, V. A. Cortés, S. Rashid [et al.] // eLife. – 2017. – Vol. 6. – P. e25015.

235. Rule, D. C. Direct transesterification of total fatty acids of adipose tissue, and of freeze-dried muscle and liver with boron-trifluoride in methanol / D. C. Rule // Meat Science. – 1997. – Vol. 46. – № 1. – P. 23-32.

236. Statin therapy and plasma free fatty acids: a systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials / A. Sahebkar, L. E. Simental-Mendía, C. Pedone [et al.] // British Journal of Clinical Pharmacology. – 2016. – Vol. 81. – № 5. – P. 807.

237. Omega-3 Fatty Acids and Exercise in Obesity Management: Independent and Synergistic Benefits in Metabolism and Knowledge Gaps / V. Sandoval, Á. Vergara-Nieto, A. Bentes [et al.] // Biology. – 2025. – Vol. 14. – № 5. – P. 463.

238. Lorenzo’s oil inhibits ELOVL1 and lowers the level of sphingomyelin with a saturated very long-chain fatty acid / T. Sassa, T. Wakashima, Y. Ohno, A. Kihara // Journal of Lipid Research. – 2014. – Vol. 55. – № 3. – P. 524-530.

239. Schade, D. S. Residual Cardiovascular Risk–Is Inflammation the Primary Cause? / D. S. Schade, R. P. Eaton // World Journal of Cardiovascular Diseases. – 2018. – Vol. 08. – № 01. – P. 59-69.

240. Relationship between the omega-3 index and specialized pro-resolving lipid mediators in patients with peripheral arterial disease taking fish oil supplements / M. S. Schaller, G. J. Zahner, W. J. Gasper [et al.] // Journal of Clinical Lipidology. – 2017. – Vol. 11. – № 5. – P. 1289-1295.

241. Schisterman, E. F. Confidence Intervals for the Youden Index and Corresponding Optimal Cut-Point / E. F. Schisterman, N. Perkins // Communications in Statistics - Simulation and Computation. – 2007. – Vol. 36. – № 3. – P. 549-563.

242. Plasma levels of EPA and DHA after ingestion of a single dose of EPA and DHA ethyl esters / H. M. Schmieta, T. Greupner, I. Schneider [et al.] // Lipids. – 2025. – Vol. 60. – № 1. – P. 15-23.

243. Determination of red blood cell fatty acid profiles: Rapid and high-confident analysis by chemical ionization-gas chromatography-tandem mass spectrometry / Y.

Schober, H. G. Wahl, H. Renz, W. A. Nockher // Journal of Chromatography B. – 2017. – Vol. 1040. – P. 1-7.

244. The Impact of Simvastatin on Lipidomic Markers of Cardiovascular Risk in Human Liver Cells Is Secondary to the Modulation of Intracellular Cholesterol / Y. L. Schooneveldt, C. Giles, M. F. Keating [et al.] // Metabolites. – 2021. – Vol. 11. – № 6. – P. 340.

245. Intake and metabolism of omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: nutritional implications for cardiometabolic diseases / M. B. Schulze, A. M. Minihane, R. N. M. Saleh, U. Risérus // The Lancet Diabetes & Endocrinology. – 2020. – Vol. 8. – № 11. – P. 915-930.

246. Schwingshackl, L. Monounsaturated Fatty Acids and Risk of Cardiovascular Disease: Synopsis of the Evidence Available from Systematic Reviews and Meta-Analyses / L. Schwingshackl, G. Hoffmann // Nutrients. – 2012. – Vol. 4. – № 12. – P. 1989.

247. Serum Polyunsaturated Fatty Acids Correlate with Serum Cytokines and Clinical Disease Activity in Crohn’s Disease / E. A. Scoville, M. M. Allaman, D. W. Adams [et al.] // Scientific Reports. – 2019. – Vol. 9. – № 1. – P. 2882.

248. Statins Activate Human PPAR Promoter and Increase PPAR mRNA Expression and Activation in HepG2 Cells / M. Seo, I. Inoue, M. Ikeda [et al.] // PPAR Research. – 2008. – Vol. 2008. – № 1. – P. 316306.

249. Development and Validation of a LC–MS/MS-Based Assay for Quantification of Free and Total Omega 3 and 6 Fatty Acids from Human Plasma / V. Serafim, D.-A. Tiugan, N. Andreescu [et al.] // Molecules. – 2019. – Vol. 24. – № 2. – P. 360.

250. Impact of methods used to express levels of circulating fatty acids on the degree and direction of associations with blood lipids in humans / S. Sergeant, I. Ruczinski, P. Ivester [et al.] // British Journal of Nutrition. – 2016. – Vol. 115. – № 2. – P. 251-261.

251. Impact of FADS gene variation and dietary fatty acid exposure on biochemical and anthropomorphic phenotypes in a Hispanic/Latino cohort / S. Sergeant, B. A. Keith, M. C. Seeds [et al.] // Frontiers in Nutrition. – 2023. – Vol. 10. – P. 1111624.

252. Serhan, C. N. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology / C. N. Serhan // Nature. – 2014. – Vol. 510. – № 7503. – P. 92-101.

253. The Atlas of Inflammation Resolution (AIR) / C. N. Serhan, S. K. Gupta, M. Perretti [et al.] // Molecular Aspects of Medicine. – 2020. – Vol. 74. – P. 100894.

254. Serhan, C. N. Resolvins in inflammation: emergence of the pro-resolving superfamily of mediators / C. N. Serhan, B. D. Levy // Journal of Clinical Investigation. – 2018. – Vol. 128. – № 7. – P. 2657-2669.

255. Serhan, C. N. Resolvins and Protectins in Inflammation Resolution / C. N. Serhan, N. A. Petasis // Chemical Reviews. – 2011. – Vol. 111. – № 10. – P. 5922-5943.

256. Sethi, S. Recent advances in lipidomics: Analytical and clinical perspectives / S. Sethi, E. Brietzke // Prostaglandins & Other Lipid Mediators. – 2017. – Vol. 128–129. – P. 8-16.

257. Silva-Velasco, D. L. ACE inhibitors and their interaction with systems and molecules involved in metabolism / D. L. Silva-Velasco, L. G. Cervantes-Pérez, A. Sánchez-Mendoza // Heliyon. – 2024. – Vol. 10. – № 2. – P. e24655.

258. Translating n-3 polyunsaturated fatty acid status from whole blood to plasma and red blood cells during pregnancy / L. A. Simmonds, L. N. Yelland, K. P. Best [et al.] // Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids. – 2022. – Vol. 176. – P. 102367.

259. A Novel Anti-Inflammatory Role of Omega-3 PUFAs in Prevention and Treatment of Atherosclerosis and Vascular Cognitive Impairment and Dementia / M. Simonetto, M. Infante, R. L. Sacco [et al.] // Nutrients. – 2019. – Vol. 11. – № 10. – P. 2279.

260. Simopoulos, A. P. Omega-6 and omega-3 fatty acids: Endocannabinoids, genetics and obesity / A. P. Simopoulos // OCL. – 2020. – Vol. 27. – P. 7.

261. Omega-3 Fatty Acids for the Management of Hypertriglyceridemia: A Science Advisory From the American Heart Association / A. C. Skulas-Ray, P. W. F. Wilson, W. S. Harris [et al.] // Circulation. – 2019. – Vol. 140. – № 12. – P. E673-E691.

262. Metabolomic Consequences of Genetic Inhibition of PCSK9 Compared With Statin Treatment / E. Sliz, J. Kettunen, M. V. Holmes [et al.] // Circulation. – 2018. – Vol. 138. – № 22. – P. 2499-2512.

263. Enriched Marine Oil Supplements Increase Peripheral Blood Specialized Pro-Resolving Mediators Concentrations and Reprogram Host Immune Responses / P. R. Souza, R. M. Marques, E. A. Gomez [et al.] // Circulation Research. – 2020. – Vol. 126. – № 1. – P. 75-90.

264. Intake of saturated and trans unsaturated fatty acids and risk of all cause mortality, cardiovascular disease, and type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of observational studies / R. J. de Souza, A. Mente, A. Maroleanu [et al.] // BMJ. – 2015. – Vol. 351. – P. h3978.

265. High Variability in Erythrocyte, Plasma and Whole Blood EPA and DHA Levels in Response to Supplementation / C. Sparkes, A. J. Sinclair, R. A. Gibson [et al.] // Nutrients. – 2020. – Vol. 12. – № 4. – P. 1017.

266. Sprecher, H. Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids / H. Sprecher // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids. – 2000. – Vol. 1486. – № 2–3. – P. 219-231.

267. Translating plasma and whole blood fatty acid compositional data into the sum of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid in erythrocytes / K. D. Stark, J. J. Aristizabal Henao, A. H. Metherel, L. Pilote // Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids. – 2016. – Vol. 104. – P. 1-10.

268. Global survey of the omega-3 fatty acids, docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid in the blood stream of healthy adults / K. D. Stark, M. E. Van Elswyk, M. R. Higgins [et al.] // Progress in Lipid Research. – 2016. – Vol. 63. – P. 132-152.

269. Long-Chain Free Fatty Acid Profiling Analysis by Liquid Chromatography–Mass Spectrometry in Mouse Treated with Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α Agonist / H. Takahashi, H. Suzuki, K. Suda [et al.] // Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. – 2013. – Vol. 77. – № 11. – P. 2288-2293.

270. Fatty acid desaturase 2 is up-regulated by the treatment with statin through geranylgeranyl pyrophosphate-dependent Rho kinase pathway in HepG2 cells / S. Tanaka, N. Ishihara, S. Suzuki [et al.] // Scientific Reports. – 2019. – Vol. 9. – № 1. – P. 10009.

271. Quantitative analysis of endogenous compounds / R. Thakare, Y. S. Chhonker, N. Gautam [et al.] // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2016. – Vol. 128. – P. 426-437.

272. Tibshirani, R. Regression Shrinkage and Selection Via the Lasso / R. Tibshirani // Journal of the Royal Statistical Society Series B: Statistical Methodology. – 1996. – Vol. 58. – № 1. – P. 267-288.

273. Tiwari, G. Bioanalytical method validation: An updated review / G. Tiwari, R. Tiwari // Pharmaceutical Methods. – 2010. – Vol. 1. – № 1. – P. 25.

274. Limitations of deuterium-labeled internal standards for quantitative electrospray ionization mass spectrometry analysis of fatty acid metabolites / S. M. Tokuoka, A. Yasumoto, Y. Kita [et al.] // Rapid Communications in Mass Spectrometry. – 2020. – Vol. 34. – № 13. – P. e8814.

275. Global variations in omega-3 fatty acid status and omega-6:omega-3 ratios: insights from > 500,000 whole-blood dried blood spot samples / M. Torrissen, E. Gisslevik, T. E. Gundersen [et al.] // Lipids in Health and Disease. – 2025. – Vol. 24. – № 1. – P. 260.

276. Inflammation during Percutaneous Coronary Intervention–Prognostic Value, Mechanisms and Therapeutic Targets / B. Tucker, K. Vaidya, B. J. Cochran, S. Patel // Cells. – 2021. – Vol. 10. – № 6. – P. 1391.

277. Aerobic Physical Activity and a Low Glycemic Diet Reduce the AA/EPA Ratio in Red Blood Cell Membranes of Patients with NAFLD / V. Tutino, V. De Nunzio, M. G. Caruso [et al.] // Nutrients. – 2018. – Vol. 10. – № 9. – P. 1299.

278. Mechanistic insights and biomarker discovery in immune cell aging and age-associated diseases / P. Upadhyay, A. Suhail, P. Khanal, S. Kumar // Frontiers in Immunology. – 2025. – Vol. 16. – P. 1637191.

279. Upregulation of hepatic LDL transport by n-3 fatty acids in LDL receptor knockout mice / C. Vasandani, A. I. Kafrouni, A. Caronna [et al.] // Journal of Lipid Research. – 2002. – Vol. 43. – № 5. – P. 772-784.

280. Miniaturized liquid chromatography focusing on analytical columns and mass spectrometry: A review / E. Vasconcelos Soares Maciel, A. L. de Toffoli, E. Sobieski [et al.] // Analytica Chimica Acta. – 2020. – Vol. 1103. – P. 11-31.

281. The metabolism of 7,10,13,16,19-docosapentaenoic acid to 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid in rat liver is independent of a 4-desaturase. / A. Voss, M. Reinhart, S. Sankarappa, H. Sprecher // Journal of Biological Chemistry. – 1991. – Vol. 266. – № 30. – P. 19995-20000.

282. Temperature-programmed capillary high-performance liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for analysis of fatty acid methyl esters / V. Vrkoslav, B. Rumlová, T. Strmeň, J. Cvačka // Journal of Separation Science. – 2020. – Vol. 43. – № 13. – P. 2579-2588.

283. Vrkoslav, V. Identification of the double-bond position in fatty acid methyl esters by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry / V. Vrkoslav, J. Cvačka // Journal of Chromatography A. – 2012. – Vol. 1259. – P. 244-250.

284. Metabolism pathways of arachidonic acids: mechanisms and potential therapeutic targets / B. Wang, L. Wu, J. Chen [et al.] // Signal Transduction and Targeted Therapy. – 2021. – Vol. 6. – № 1. – P. 94.

285. An LC-MS/MS method for comparing the stability of ethanol's non-oxidative metabolites in dried blood spots during 90 days / H. Wang, Y. Zhang, X. Zhang [et al.] // Alcohol. – 2020. – Vol. 83. – P. 29-35.

286. Association Between Omega-3 Fatty Acid Intake and Dyslipidemia: A Continuous Dose-Response Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials / T. Wang, X. Zhang, N. Zhou [et al.] // Journal of the American Heart Association. – 2023. – Vol. 12. – № 11. – P. e029512.

287. Adrenic acid: A promising biomarker and therapeutic target (Review) / Z. Wang, H. Gao, X. Ma [et al.] // International Journal of Molecular Medicine. – 2024. – Vol. 55. – № 2. – P. 20.

288. Warren, C. R. A liquid chromatography–mass spectrometry method for analysis of intact fatty-acid-based lipids extracted from soil / C. R. Warren // European Journal of Soil Science. – 2018. – Vol. 69. – № 5. – P. 791-803.

289. Warton, D. I. The arcsine is asinine: the analysis of proportions in ecology / D. I. Warton, F. K. C. Hui // Ecology. – 2011. – Vol. 92. – № 1. – P. 3-10.

290. Development and validation of a method for the simultaneous analysis of fatty acid ethyl esters, ethyl sulfate and ethyl glucuronide in neonatal meconium: application in two cases of alcohol consumption during pregnancy / M. K. Woźniak, L. Banaszkiewicz, J. Aszyk [et al.] // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2021. – Vol. 413. – № 11. – P. 3093-3105.

291. Fatty acids and lipid mediators in inflammatory bowel disease: from mechanism to treatment / D. Yan, S. Ye, Y. He [et al.] // Frontiers in Immunology. – 2023. – Vol. 14. – P. 1286667.

292. The effect of omega-3 fatty acids and its combination with statins on lipid profile in patients with hypertriglyceridemia: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials / Y. Yang, W. Deng, Y. Wang [et al.] // Frontiers in Nutrition. – 2022. – Vol. 9. – P. 1039056.

293. Rosuvastatin as a potential preventive drug for the development of hepatocellular carcinoma associated with non-alcoholic fatty liver disease in mice / K. Yokohama, S. Fukunishi, M. Ii [et al.] // International Journal of Molecular Medicine. – 2016. – Vol. 38. – № 5. – P. 1499-1506.

294. Effects of eicosapentaenoic acid on major coronary events in hypercholesterolaemic patients (JELIS): a randomised open-label, blinded endpoint analysis / M. Yokoyama, H. Origasa, M. Matsuzaki [et al.] // The Lancet. – 2007. – Vol. 369. – № 9567. – P. 1090-1098.

295. Youden, W. J. Index for rating diagnostic tests / W. J. Youden // Cancer. – 1950. – Vol. 3. – № 1. – P. 32-35.

296. Residual inflammatory risk predicts long-term outcomes following stenting for symptomatic intracranial atherosclerotic stenosis / Y. Yu, Y. Lou, Y. Pan [et al.] // Stroke and Vascular Neurology. – 2024. – Vol. 9. – № 4. – P. 407-417.

297. Yuan, Z. Combining Multiple Biomarker Models in Logistic Regression / Z. Yuan, D. Ghosh // Biometrics. – 2008. – Vol. 64. – № 2. – P. 431-439.

298. Clinical Significance of Serum Omega-3 Fatty Acids on Endothelial Function in Patients with Coronary Artery Disease Under Statin Therapy / K. Yunoki, H. Matsumi, T. Miyoshi [et al.] // Journal of Cardiovascular Development and Disease. – 2025. – Vol. 12. – № 2. – P. 60.

299. Zehethofer, N. Plasma free fatty acid profiling in a fish oil human intervention study using ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry / N. Zehethofer, D. M. Pinto, D. A. Volmer // Rapid Communications in Mass Spectrometry. – 2008. – Vol. 22. – № 13. – P. 2125-2133.

300. Simultaneous determination of ethanol’s four types of non-oxidative metabolites in human whole blood by liquid chromatography tandem mass spectrometry / X. Zhang, F. Zheng, Z. Lin [et al.] // Analytica Chimica Acta. – 2017. – Vol. 963. – P. 68-75.

301. Role of inflammation, immunity, and oxidative stress in hypertension: New insights and potential therapeutic targets / Z. Zhang, L. Zhao, X. Zhou [et al.] // Frontiers in Immunology. – 2023. – Vol. 13. – P. 1098725.

302. Trained Immunity: An Underlying Driver of Inflammatory Atherosclerosis / C. Zhong, X. Yang, Y. Feng, J. Yu // Frontiers in Immunology. – 2020. – Vol. 11. – P. 522636.

303. Determination of four omega-3 polyunsaturated fatty acids by UPLC-MS/MS in plasma of hyperlipidemic and normolipidemic subjects / B. Zhou, C. Lin, S. Xie [et al.] // Journal of Chromatography B. – 2019. – Vol. 1126-1127. – P. 121762.

304. Trained Immunity as a Trigger for Atherosclerotic Cardiovascular Disease–A Literature Review / N. A. Zieleniewska, M. Kazberuk, M. Chlabicz [et al.] // Journal of Clinical Medicine. – 2022. – Vol. 11. – № 12. – P. 3369.

305. Züllig, T. Lipidomics from sample preparation to data analysis: a primer / T. Züllig, M. Trötzmüller, H. C. Köfeler // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2020. – Vol. 412. – № 10. – P. 2191-2209.

306. N-3 PUFA Supplementation Triggers PPAR-α Activation and PPAR-α/NF-κB Interaction: Anti-Inflammatory Implications in Liver Ischemia-Reperfusion Injury / J. Zúñiga, M. Cancino, F. Medina [et al.] // PLoS ONE. – 2011. – Vol. 6. – № 12. – P. e28502.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Таблица А.1 – Распределение основных классов сопутствующей терапии и частоты сахарного диабета в подгруппах группы «Атеросклероз» в зависимости от статуса терапии статинами [91]

Класс препаратов	**Без статинов (n = 12)**	**Аторвастатин (n = 19)**	**Розувастатин (n = 21)**	***p*-значение***
Ингибиторы АПФ	3 (25,0 %)	7 (36,8 %)	8 (38,1 %)	0,81
Сартаны	4 (33,3 %)	4 (21,1 %)	8 (38,1 %)	0,55
Любой ингибитор РААС	7 (58,3 %)	11 (57,9 %)	16 (76,2 %)	0,43
Дигидропиридиновые антагонисты кальция	3 (25,0 %)	6 (31,6 %)	8 (38,1 %)	0,81
β-адреноблокаторы	5 (41,7 %)	11 (57,9 %)	14 (66,7 %)	0,37
Сахарный диабет	1 (8,3 %)	8 (42,1 %)	3 (14,3 %)	0,07
Примечание: * *p*- значения получены при одновременном сравнении трёх подгрупп с использованием точного критерия Фишера–Фримена–Холтона. Ограниченный объём подгрупп определяет недостаточную статистическую мощность: отсутствие статистически значимых различий не следует трактовать как доказательство эквивалентности подгрупп.				

Таблица А.2 – Распределение доз статинов, интенсивность терапии и достижение целевого уровня ХС ЛПНП у пациентов группы «Атеросклероз» [92]

Подгруппа	**n**	**Доза, мг (n)**	**Интенсивность терапии: высокая / умеренная, n**	**ХС ЛПНП, ммоль/л, Me [Q1; Q3]**	**Достижение ХС ЛПНП < 1,4 ммоль/л**
Без терапии статинами	12	не применимо	не применимо	3,88 [3,22; 4,57]	0/12 (0,0 %)
Аторвастатин	19	20 мг (14); 40 мг (5)	5 / 14	2,34 [2,04; 2,83]	1/19 (5,3 %)
Розувастатин	21	5 мг (4); 10 мг (2); 20 мг (13); 40 мг (2)	15 / 6	2,95 [2,35; 3,57]	2/21 (9,5 %)
Терапия статинами, всего	40	аторвастатин 20-40 мг; розувастатин 5-40 мг	20 / 20	2,56 [2,23; 3,24]	3/40 (7,5 %)
Примечание: для использованных препаратов высокая интенсивность: аторвастатин 40–80 мг и розувастатин 20-40 мг; умеренная интенсивность: аторвастатин 10–20 мг и розувастатин 5–10 мг. Целевой уровень ХС ЛПНП < 1,4 ммоль/л соответствует категории очень высокого сердечно-сосудистого риска. В этой выборке исходные значения ХС ЛПНП до начала терапии статинами отсутствовали, поэтому оценивалось только достижение абсолютного целевого уровня на момент включения в исследование.					

Таблица А.3 – Устойчивость дискриминирующей способности (AUC) диагностических маркеров к исключению пациентов с сахарным диабетом (повторный ROC-анализ при сравнении с контрольной группой) [92]

Сравнение	Показатель	C18:0/C18:1n-9	C20:4n-6/C22:4n-6	ИБ ω-6/ω-3
Контроль–аторвастатин	AUC (полная)	0,835	0,741	0,734
	AUC (без СД)	0,782	0,803	0,850
	p (без СД)	0,0037	0,0019	0,0003
Контроль–розувастатин	AUC (полная)	0,858	0,669	0,780
	AUC (без СД)	0,845	0,664	0,763
	p (без СД)	< 0,0001	0,0416	0,0015
Контроль–без статинов	AUC (полная)	0,831	0,698	0,741
	AUC (без СД)	0,810	0,687	0,728
	p (без СД)	0,0022	0,0448	0,0247

Примечание: AUC (полная) приведены по таблице 3.12 (вся выборка); AUC (без СД) и значения *p* рассчитаны после исключения пациентов с сахарным диабетом. Объём подгрупп без сахарного диабета: аторвастатин 11, розувастатин 18, без статинов 11; контрольная группа 48. Значение *p* соответствует проверке AUC относительно 0,5 (критерий Вальда).

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Таблица Б.1 – MRM-переходы МЭЖК [93]

Название	Аддукт	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	Время, мин	DP (В)	EP (В)	CE (В)	CXP (В)
C12:0	$[M+ NH_4]^+$	232,3	215,3	4,8	10	10	13	13
C14:0	$[M+ NH_4]^+$	260,3	243,3	7,8	10	10	13	13
C16:0	$[M+ NH_4]^+$	288,3	271,3	10,6	10	10	13	13
C18:0	$[M+ NH_4]^+$	316,2	299,2	12,8	10	10	13	13
C20:0	$[M+ NH_4]^+$	344,3	327,3	13,8	10	10	13	13
C22:0	$[M+ NH_4]^+$	372,3	355,3	14,8	10	10	13	13
C24:0	$[M+ NH_4]^+$	400,3	383,3	16	10	10	13	13
C17:0 (ВС)	$[M+ NH_4]^+$	302,3	285,3	11,8	10	10	13	13
C16:1n-7	$[M+ NH_4]^+$	286,3	269,3	8,4	15	10	11	11
C18:1n-9	$[M+ NH_4]^+$	314,3	297,3	10,9	15	10	11	11
C20:1n-9	$[M+ NH_4]^+$	342,3	325,3	12,9	15	10	11	11
C24:1n-9	$[M+ NH_4]^+$	398,3	381,3	14,8	15	10	11	11
C16:1 *транс*	$[M+ NH_4]^+$	286,3	269,3	8,9	15	10	11	11
C18:1 *транс*	$[M+ NH_4]^+$	314,3	297,3	11,3	15	10	11	11
C18:2 *транс*	$[M+ NH_4]^+$	312,3	295,3	9,9	15	10	11	11
C18:2n-6	$[M+ NH_4]^+$	312,3	295,3	9,9	15	10	11	11
C18:3n-6	$[M+ NH_4]^+$	310,3	293,3	7,0	15	10	11	11
C20:2n-6	$[M+ NH_4]^+$	340,3	323,3	11,4	15	10	11	11
C20:3n-6	$[M+ NH_4]^+$	338,3	321,3	9,9	15	10	11	11
C20:4n-6	$[M+ NH_4]^+$	336,3	319,3	8,4	15	10	11	11
C22:4n-6	$[M+ NH_4]^+$	364,3	347,3	10,5	15	10	11	11
C22:5n-3	$[M+ NH_4]^+$	362,3	345,3	8,9	15	10	11	11
ЭПК C20:5n-3	$[M+ NH_4]^+$	334,3	317,3	6,4	15	10	11	11
ДГК C22:6n-3	$[M+ NH_4]^+$	360,3	343,3	7,5	15	10	12	11
C12:0	$[M+H]^+$	215,3	103,0	4,8	100	10	19	6
C14:0	$[M+H]^+$	243,3	103,0	7,8	100	10	21	6
C16:0	$[M+H]^+$	271,3	103,0	10,6	100	10	25	6
C18:0	$[M+H]^+$	299,2	103,0	12,8	100	10	25	6
C20:0	$[M+H]^+$	327,2	103,0	13,8	100	10	25	6
C22:0	$[M+H]^+$	355,3	103,0	14,8	100	10	25	6
C24:0	$[M+H]^+$	383,3	103,0	16	100	10	25	6
C17:0 (ВС)	$[M+H]^+$	285,3	103,0	11,8	100	10	25	6
C16:1n-7	$[M+H]^+$	269,3	237,3	8,4	85	10	15	11
C18:1n-9	$[M+H]^+$	297,3	265,2	10,9	85	10	15	11
C20:1n-9	$[M+H]^+$	325,3	293,3	12,9	85	10	15	11
C24:1n-9	$[M+H]^+$	381,3	349,3	14,8	85	10	15	11
C16:1 *транс*	$[M+H]^+$	269,3	237,3	8,9	85	10	15	11
C18:1 *транс*	$[M+H]^+$	297,3	265,3	11,3	85	10	15	11
C18:2 *транс*	$[M+H]^+$	295,3	263,3	9,9	85	10	15	11
C18:2n-6	$[M+H]^+$	295,3	263,3	9,9	85	10	15	11
C18:3n-6	$[M+H]^+$	293,3	261,3	7,0	85	10	15	11
C20:2n-6	$[M+H]^+$	323,3	291,3	11,4	85	10	15	11
C20:3n-6	$[M+H]^+$	321,3	289,3	9,9	85	10	15	11

Продолжение Таблицы Б.1

С20:4n-6	$[M+H]^+$	319,3	287,3	8,4	85	10	15	11
С22:4n-6	$[M+H]^+$	347,3	315,3	10,5	85	10	15	11
С22:5n-3	$[M+H]^+$	345,3	313,3	8,9	85	10	15	11
ЭПК С20:5n-3	$[M+H]^+$	317,3	285,3	6,4	85	10	15	11
ДГК С22:6n-3	$[M+H]^+$	343,3	311,2	7,5	85	10	15	11
Примечание: DP — потенциал декластеризации; EP — входной потенциал; CE — энергия соударений; CXP — потенциал на выходе из ячейки соударений.								