

Снижение уровня окислительно модифицированных липопротеидов низкой плотности ингибитором PCSK9 у больных ишемической болезнью сердца

В.З. ЛАНКИН¹, А.К. ТИХАЗЕ¹, М. ВИЙГИМАА², И.Е. ЧАЗОВА¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава России, Москва, Россия;

²Центр кардиологии Таллиннского технологического университета, Таллинн, Эстония

Резюме

Цель исследования. Работа посвящена исследованию динамики содержания окислительно модифицированных липопротеидов низкой плотности (ок-ЛПНП) в плазме крови, а также изучению изменения активности ключевых антиоксидантных ферментов в эритроцитах – Se-содержащей глутатионпероксидазы (GSH-Px), Cu,Zn-супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы у больных ишемической болезнью сердца (ИБС) в процессе терапии ингибитором PCSK9 эволокумабом.

Материалы и методы. В исследование включено 9 мужчин со стабильной ИБС в возрасте 59±10 лет, у которых имелось документированное подтверждение атеросклеротического поражения не менее одной магистральной коронарной артерии по данным коронароангиографии. Пациенты принимали стандартную терапию, включая антиагреганты, β-блокаторы и ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента/антагонисты рецепторов ангиотензина, причем до начала исследования все принимали максимально переносимую дозу статинов. Поскольку за время терапии статинами не достигнуто целевых уровней холестерина (ХС) липопротеидов низкой плотности (ХС ЛПНП), пациентам назначена гиполипидемическая терапия с включением ингибитора PCSK9 эволокумаб фирмы Amgen в дозе 420 мг 1 раз в месяц. Содержание показателей липидного обмена определяли стандартными биохимическими методами. Уровень ок-ЛПНП в плазме крови определяли иммунохимическим методом. Активность антиоксидантных ферментов определяли в эритроцитах крови, используя биохимические методики.

Результаты. Холестеринснижающий препарат нового типа – ингибитор *protein convertase subtilisin/kexin* типа 9 (PCSK9) эволокумаб (Amgen) не только эффективно снижает уровень ХС ЛПНП, но также значительно уменьшает содержание ок-ЛПНП в плазме крови. В отличие от статинов ингибитор PCSK9 не вызывает снижения активности антиоксидантных ферментов крови.

Заключение. Ингибитор PCSK9 не влияет на параметры окислительного стресса.

Ключевые слова: холестеринснижающие препараты, ингибитор PCSK9, окисленные липопротеиды низкой плотности, антиоксидантные ферменты.

PCSK9 Inhibitor causes a decrease in the level of oxidatively modified low-density lipoproteins in patients with coronary artery diseases

V.Z. LANKIN¹, A.K. TIKHAZE¹, M. VIIGIMAA², I.E. CHAZOVA¹

¹FSBI "National Medical Research Cardiology Center" of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia;

²Center for Cardiology of Tallinn University of Technology, Tallinn, Estonia

Aim. We study the dynamics of oxidatively modified low-density lipoprotein (ox-LDL) content in blood plasma, as well as changes in the activity of key antioxidant enzymes such as Se-containing glutathione peroxidase (GSH-Px) Cu,Zn-superoxide dismutase (SOD) and catalase in erythrocytes of patients with coronary artery disease during treatment with PCSK9 inhibitor (evolocumab).

Materials and methods. The study included 9 men (59 ± 10 years) with coronary artery disease with atherosclerotic lesion at least one main coronary artery according to coronary angiography. Patients took standard therapy before taking the study, everyone took the maximum tolerated dose of statins. Since the target cholesterol levels of low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) were not achieved during the statin therapy, patients were prescribed lipid-lowering therapy with the inclusion of the inhibitor PCSK9-emococumab from Amgen 420 mg once a month. The content of lipid metabolism indices was determined by standard biochemical methods. The level of ox-LDL in the blood plasma was determined by the immunochemical method. The activity of antioxidant enzymes was determined in blood erythrocytes using biochemical techniques

Results. Cholesterol-lowering drug of the new type – inhibitor protein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) evolocumab (Amgen) not only effectively lowers the level of cholesterol in low density lipoprotein (LDL), but also significantly reduces the content of oxidatively modified LDL in blood plasma. Unlike statins, the inhibitor of PCSK9 does not cause a decrease in the activity of antioxidant enzymes of the blood.

Conclusion. PCSK9 inhibitor has no effect on the parameters of oxidative stress.

Keywords: cholesterol-lowering drugs, inhibitor of PCSK9, oxidized low-density lipoproteins, antioxidant enzymes.

АРА – антагонисты рецепторов ангиотензина

ИАПФ – ангиотензинпревращающий фермент

ИБС – ишемическая болезнь сердца

ЛПНП – липопротеиды низкой плотности

МДА – малоновый диальдегид

ок-ЛПНП – окислительно модифицированные ЛПНП

СОД – Cu,Zn-супероксиддисмутазы

ХС – холестерин

ХС ЛПВП – холестерин липопротеидов высокой плотности

ХС ЛПНП – холестерин липопротеидов низкой плотности

GSH-Px – Se-содержащая глутатионпероксидаза

В настоящее время использование гиполипидемических лекарственных средств является одним из основных принципов медикаментозной терапии ишемической болезни

сердца (ИБС) и атеросклероза. В частности, в качестве холестеринснижающих препаратов активно используют ингибиторы ГМГ-КоА-редуктазы (статины), которые подав-

ляют синтез холестерина (ХС) на ранней стадии – на стадии образования мевалоновой кислоты [1–3]. Тем не менее ингибирование биосинтеза ХС лекарственными препаратами этого класса одновременно приводит к подавлению синтеза изопrenoидов и, соответственно, снижению образования двух важнейших компонентов природной антиоксидантной системы – коэнзима Q_{10} и GSH-Px [3, 4]. Следует отметить, что при терапии статинами у ряда больных наблюдаются характерные побочные явления, такие как миалгии, миопатии и в тяжелых случаях рабдомиолиз и почечная недостаточность, связанные с дефицитом коэнзима Q_{10} – промежуточного переносчика электронов в митохондриальной дыхательной цепи мышечных клеток [4, 5]. Так, установлено снижение содержания коэнзима Q_{10} в липопротеидах низкой плотности (ЛПНП) при терапии статинами [5], причем нами обнаружено, что при действии статинов имеет место существенное снижение уровня макроэргических фосфатов (аденозинтрифосфата и креатинфосфата) в кардиомиоцитах экспериментальных животных [6].

Известно, что предатеросклеротическое поражение (липоидоз) возникает при неконтролируемом захвате холестеринсодержащих ЛПНП, циркулирующих в кровяном русле, клетками стенки сосудов, вследствие чего образуются обогащенные липидами так называемые пенистые клетки [7, 8]. Полиеновые фосфолипиды наружного слоя частиц ЛПНП способны к свободнорадикальному окислению в кровотоке вследствие присутствия кислорода и инициаторов окисления – ионов железа и гемопротеидов [3, 8]. В то же время восстановленная (фенольная) форма коэнзима Q_{10} является эффективным антиоксидантом и способна защищать частицы ЛПНП от свободнорадикального окисления [2, 3]. В процессе окисления ЛПНП первичные продукты – липогидропероксиды могут претерпевать окислительную деструкцию с образованием α -оксоальдегидов, подобных 4-гидроксиноненалу и малоновому диальдегиду (МДА) [2, 8]. Альдегидные группы низкомолекулярного дикарбонила МДА способны легко реагировать с концевыми ϵ -аминогруппами аргинина в апопротеине В-100 частицы ЛПНП, что приводит к модификации структуры белковой молекулы, причем окислительно модифицированные ЛПНП (ок-ЛПНП) более эффективно захватываются клетками стенки сосудов с образованием пенистых клеток при помощи скэвинджер-рецепторов [8, 9]. Таким образом, подавление статином биосинтеза ХС одновременно с уменьшением эффективности антиоксидантной защиты может приводить к усилению свободнорадикального окисления частиц ЛПНП, провоцируя атерогенные повреждения в стенке сосудов. Прямое антиоксидантное действие статинов не установлено, тем не менее в литературе имеются сведения об опосредованном «антиоксидантном» действии статинов [10]. Нами впервые в двойных слепых плацебо-контролируемых клинических исследованиях продемонстрировано экстремальное увеличение уровня ок-ЛПНП при терапии больных ИБС статинами одновременно со снижением активности Se-содержащей глутатионпероксидазы (GSH-Px), причем показано, что препараты коэнзима Q_{10} и синтетических фенольных анти-

оксидантов полностью подавляют прооксидантный эффект статинов [2, 3]. Еще одним из распространенных побочных эффектов статинов, кроме отмеченных выше, является обнаружение повышенного уровня трансаминаз печени – аламинотрансферазы и аспартатаминотрансферазы в кровяном русле. Можно полагать, что это действие статинов связано с увеличением проницаемости гепатоцитов, которое, как показано в наших экспериментах, может быть вызвано инициацией свободнорадикального окисления в биомембранах клеток печени при введении статинов [9]. Исходя из вышесказанного, назрела необходимость использования в качестве холестеринснижающих препаратов лекарственных средств, имеющих иной механизм действия. В последние годы в качестве холестеринснижающих препаратов начали использоваться лиганды рецепторов к ЛПНП – ингибиторы протеиновой конвертазы субтилизин-кексинотипа 9 (*protein convertase subtilisin/kexin type 9*, PCSK9), содержащие моноклональные антитела к PCSK9 [11, 12]. Блокада PCSK9 должна приводить к экспрессии рецепторов ЛПНП в клетках печени, в результате чего захват ЛПНП в печени должен увеличиваться, а содержание ЛПНП в плазме крови – уменьшаться. Действительно, использование препаратов, содержащих моноклональные антитела к PCSK9, приводит, по данным ряда авторитетных исследований, к стойкому и длительному снижению уровня общего ХС и ХС ЛПНП у больных ИБС [11, 12]. Тем не менее в доступной литературе отсутствуют данные о влиянии терапии с использованием ингибиторов PCSK9 на уровень ок-ЛПНП в крови больных ИБС. В связи с этим целью настоящей работы является исследование динамики содержания ок-ЛПНП в плазме крови, а также изучение изменения активности ключевых антиоксидантных ферментов в эритроцитах GSH-Px, супероксиддисмутазы (СОД), каталазы у больных ИБС в процессе терапии ингибитором PCSK9 эволюкумабом.

Материалы и методы

В исследование включено 9 мужчин со стабильной ИБС в возрасте 59 ± 10 лет, у которых имелось документированное подтверждение атеросклеротического поражения не менее одной магистральной коронарной артерии по данным коронароангиографии. Пациенты принимали стандартную терапию, включая антиагреганты, β -блокаторы, ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента (ИАПФ), антагонисты рецепторов ангиотензина (АРА), причем до начала исследования все пациенты принимали максимально переносимую дозу статинов. Поскольку за время терапии статинами не достигнуто целевых уровней ХС ЛПНП, пациентам назначена гиполипидемическая терапия с включением ингибитора PCSK9 эволюкумаб фирмы Amgen в дозе 420 мг один раз в месяц. Содержание показателей липидного обмена определяли стандартными методами на химическом анализаторе Architect С 8000 фирмы Abbott (США) с использованием реактивов этой же фирмы. Уровень ок-ЛПНП в плазме крови определяли иммунохимическим методом при помощи тест-наборов фирмы Mercodia Oxidized LDL ELISA (Швеция), содержащих моноклональные антитела mAb-4E6 к МДА-модифицированным ЛПНП [13]. Для определения активности антиоксидантных ферментов

Сведения об авторах:

Тихазе Алла Карловна – д.м.н., проф., в.н.с. отд. биохимии свободнорадикальных процессов; e-mail: allatikhaze@yandex.ru

Вийгимаа Маргус – д.м.н., проф., руководитель центра кардиологии; e-mail: MargusViigimaa@regionaalhaigla.ee

Чазова Ирина Евгеньевна – д.м.н., проф., акад. РАН, директор Института клинической кардиологии им. А.Л. Мясникова; e-mail: c34h@yandex.ru

Контактная информация:

Ланкин Вадим Зиновьевич – д.б.н., проф., руководитель отд. биохимии свободнорадикальных процессов; тел.: 8(495)414-65-11; 8(916)313-31-88; e-mail: lankin941@mail.ru

красные кровяные клетки лизировали в 5 мМ К,Na-фосфатном буфере pH 7,4, после чего лизаты эритроцитов центрифугировали в рефрижераторной центрифуге при 800 g в течение 15 мин. Измерение активности ферментов проводили на регистрирующем спектрофотометре Shimadzu UV2600 (Япония). Активность ферментов выражали в ед/г Hb, исследование каждого образца повторяли трижды. Активность GSH-Px определяли в сопряженной глутатион-редуктазной системе по скорости окисления NADPH при 340 нм с гидропероксидом трет-бутила в качестве субстрата в нашей модификации [14]. Активность СОД определяли согласно методу [14] по ингибированию восстановления синего нитротетразолия супероксидным радикалом, генерируемым в системе ксантин-ксантинооксидаза, определяя кинетику образования формазана при 560 нм, предварительно осаждая гемоглобин смесью этанол-хлороформ (3:5). Активность каталазы определяли по скорости утилизации пероксида водорода при 240 нм [14]. Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ STATISTICA 10, применяя непараметрические методы статистического анализа. Статистически достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что уровни ХС в липопротеидах высокой плотности (ХС ЛПВП) и триглицеридов достоверно не изменяются в процессе терапии ингибитором PCSK9 за все время наблюдения по сравнению с соответствующими показателями до начала лечения (данные не приводятся). Как и следовало ожидать, уровень общего ХС существенно уменьшался через 3 мес после начала терапии ингибитором PCSK9 (на 41,2%; $p < 0,01$), причем этот сниженный уровень общего ХС сохранялся в течение 12 мес после начала лечения. Снижение уровня ХС ЛПНП было более резким и составило 73,6% ($p < 0,01$) по сравнению с исходными значениями через 3 мес терапии, причем пониженный уровень ХС ЛПНП сохранялся и на более поздних сроках наблюдения. Уровень ок-ЛПНП значительно снижался уже через 1–2 мес после начала терапии с использованием ингибитора PCSK9, а через 3 мес уменьшался на 51,3% ($p < 0,01$) и оставался на пониженном уровне в течение последующих 12 мес лечения (рис. 1). При этом выявлена сильная положительная корреляция ($r = 0,79$; $p < 0,01$) между содержанием ок-ЛПНП и ХС ЛПНП (рис. 2). Активности ключевых антиоксидантных ферментов (GSH-Px, СОД, каталаза) в эритроцитах больных при терапии ингибитором PCSK9 достоверно не изменились за весь период (12 мес) наблюдения (данные не приводятся). Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что ингибитор PCSK9 обладает не только выраженным холестеринснижающим действием, но одновременно значительно снижает уровень атерогенных ок-ЛПНП и не влияет на активность ключевых антиоксидантных ферментов, что при отсутствии выявленных побочных действий делает этот препарат весьма перспективным для терапии ИБС и атеросклероза. Следует отметить, что снижение уровня ХС ЛПНП через 3 мес терапии ингибитором PCSK9 было более значительным (↓ почти в 4 раза), чем уменьшение содержания ок-ЛПНП (↓ лишь в 2 раза). Этот факт, вероятно, указывает на то, что снижение концентрации ок-ЛПНП в плазме крови не является простым отражением снижения количества частиц ЛПНП, но свидетельствует о включении неизвестных механизмов регуляции свободнорадикального окисления при действии ингибитора PCSK9. Ранее в популяционных исследованиях мы показа-

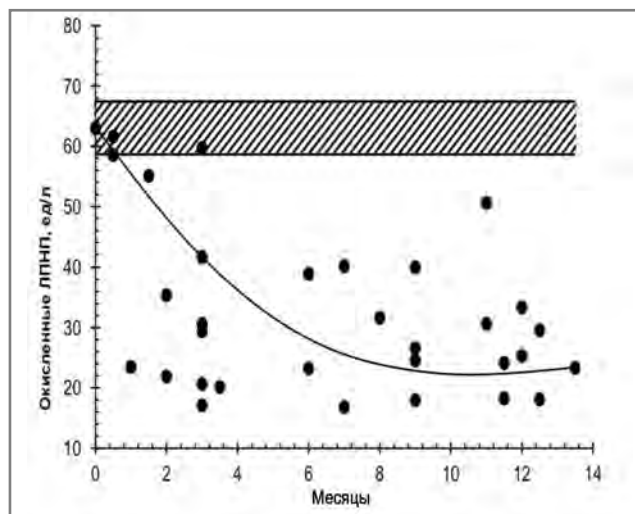


Рис. 1. Изменение содержания ок-ЛПНП у больных ИБС в процессе холестеринснижающей терапии ингибитором PCSK9.

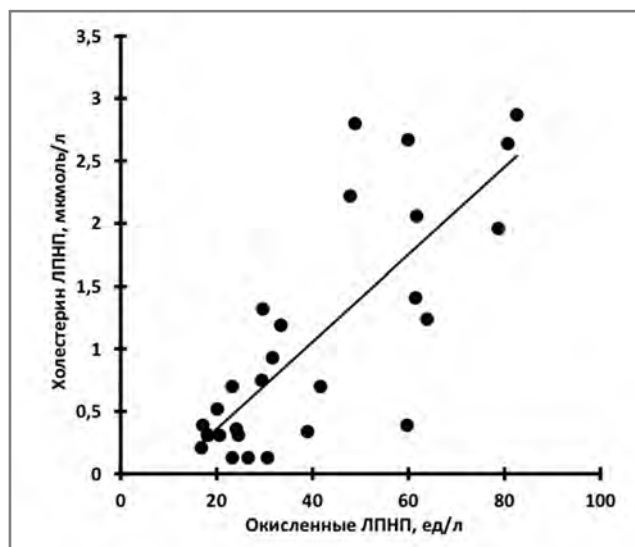


Рис. 2. Корреляционная зависимость между содержанием ХС в ЛПНП и содержанием ок-ЛПНП.

ли, что наиболее окислены те частицы ЛПНП, которые содержат наибольшее количество ХС, т.е. ЛПНП, которым приписывается наибольшая атерогенность [13]. Статины же, как показано нами ранее [2, 3], способны эффективно снижать уровень ХС ЛПНП, но одновременно стимулируют образование ок-ЛПНП.

Обсуждение

В соответствии с результатами настоящего исследования, обнаруженная нами в популяционных исследованиях положительная корреляция между уровнями ок-ЛПНП и ХС ЛПНП сохраняется и при резком уменьшении их содержания в процессе терапии ингибитором PCSK9 (см. рис. 2). В выполненных ранее исследованиях [8, 9] нами убедительно доказана важная роль окислительного стресса в этиологии и патогенезе атеросклероза и сахарного диабета типа 2, причем сформулирована гипотеза о едином молекулярном механизме повреждения стенки сосудов при этих заболеваниях [8].

Исходя из этого, симптоматичны указания на то, что стимулирование развития окислительного стресса при терапии статинами способствует возникновению диабета [15].

Заключение

Очевидно, что нынешняя доступность статинов делает их основным лекарственным средством в ряду холестеринснижающих лекарств, однако следует приветствовать

создание новых перспективных гиполипидемических препаратов, подобных ингибитору PCSK9.

В настоящее время показаниями к назначению ингибиторов PCSK9 являются наследственные гиперхолестеринемии и недостижение целевых уровней ХС ЛПНП при терапии статинами и эзетимибом.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта № 14-15 00245 П Российского научного фонда.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Nawarskas JJ. HMG-CoA reductase inhibitors and coenzyme Q10. *Cardiol Rev.* 2005;13(2):76-9. <https://doi.org/10.1097/01.crd.0000154790.42283.a1>
- Lankin VZ, Tikhaze AK, Kukharchuk VV, Konovalova GG, Pisarenko OI, Kaminniy AI, Shumaev KB, Belenkov YN. Antioxidants decreases the intensification of low density lipoprotein in vivo peroxidation during therapy with statins. *Mol Cell Biochem.* 2003;249(1-2):129-40. [Ланкин В.З., Тихазе А.К., Кухарчук В.В., Коновалова Г.Г., Писаренко О.И., Каминный А.И., Шумаев К.Б., Беленков Ю.Н. Антиоксиданты снижают интенсивность перекисидации in vivo липопротеинов низкой плотности при терапии статинами. *Mol Cell Biochem.* 2003; 249(1-2):129-40 (In Russ.)].
- Lankin VZ, Tikhaze AK. Free radical lipoperoxidation during atherosclerosis and antioxidative therapy of this disease. In: Tomasi A., et al., eds. *Free Radicals, Nitric Oxide and Inflammation: Molecular, Biochemical and Clinical Aspects.* Amsterdam, etc.: IOS Press, NATO Science Series. 2003;344:218-31.
- Moosmann B, Behl C. Selenoprotein synthesis and side-effects of statins. *Lancet.* 2004;363(9412):892-4. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)15739-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)15739-5)
- Littlefield N, Beckstrand RL, Luthy KE. Statins' effect on plasma levels of Coenzyme Q10 and improvement in myopathy with supplementation. *J Am Assoc Nurse Pract.* 2014;26(2):85-90. <https://doi.org/10.1002/2327-6924.12046>
- Pisarenko OI, Studneva IM, Lankin VZ, Konovalova GG, Tikhaze AK, Kaminnaya VI, Belenkov YN. Inhibitor of beta-hydroxy-beta-methylglutaryl coenzyme A reductase decreases energy supply to the myocardium in rats. *Bull Exp Biol Med.* 2001;132(4):956-8.
- Steinberg D, Witztum JL. Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(12):2311-6. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.179697>
- Lankin VZ, Tikhaze AK. Role of Oxidative Stress in the Genesis of Atherosclerosis and Diabetes Mellitus: A Personal Look Back on 50 Years of Research. *Curr Aging Sci.* 2017;10(1):18-25. <https://doi.org/10.2174/1874609809666160926142640> [Ланкин В.З., Тихазе А.К. Роль окислительного стресса в генезе атеросклероза и сахарного диабета: личный взгляд на 50 лет исследований. *Curr Aging Sci.* 2017;10(1):18-25. <https://doi.org/10.2174/1874609809666160926142640>]
- Lankin VZ, Tikhaze AK, Konovalova GG, Kumskova EM, Shumaev KB. Aldehyde-dependent modification of low density lipoproteins. In: *Handbook of Lipoprotein Research.* NY. Nova Sci. 2010:85-107.
- Pedersen TR. Pleiotropic effects of statins: evidence against benefits beyond LDL-cholesterol lowering. *Am J Cardiovasc Drugs.* 2010;10 (Suppl 1):10-7. <https://doi.org/10.2165/1158822-S0-000000000-00000>
- Koren MJ, Lundqvist P, Bolognese M, Neutel JM, Monsalvo ML, Yang J, Kim JB, Scott R, Wasserman SM, Bays H. Anti-PCSK9 monotherapy for hypercholesterolemia: the MENDEL-2 randomized, controlled phase III clinical trial of evolocumab. *J Am Coll Cardiol.* 2014;63(23): 2531-40. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2014.03.018>
- Koren MJ, Sabatine MS, Giugliano RP, Langslet G, Wiviott SD, Kasahun H, Ruzza A, Ma Y, Somaratne R, Raal FJ. Long-term Low-Density Lipoprotein Cholesterol-Lowering Efficacy, Persistence and Safety of Evolocumab in Treatment of Hypercholesterolemia: Results Up to 4 Years from the Open-Label OSLER-1 Extension Study. *JAMA Cardiol.* 2017;2(6):598-607. <https://doi.org/10.1001/jamacardio.2017.0747>
- Viigimaa M, Abina J, Zemtsovskaya G, Tikhaze A, Konovalova G, Kumskova E, Lankin V. Malondialdehyde-modified low-density lipoproteins as biomarker for atherosclerosis. *Blood Press.* 2010;19(3):164-8. <https://doi.org/10.3109/08037051.2010.484158>
- Lankin VZ, Konovalova GG, Tikhaze AK, Shumaev KB, Belova-Kumskova EM, Grechnikova MA, Viigimaa M. Aldehyde inhibition of antioxidant enzymes in blood of diabetic patients. *J Diabetes.* 2016;8(3):398-404. <https://doi.org/10.1111/1753-0407.12309> [Ланкин В.З., Коновалова Г.Г., Тихазе А.К., Шумаев К.Б., Белова-Кумскова Е.М., Гречникова М.А., Вийгимаа М. Альдегидное ингибирование антиоксидантных ферментов в крови пациентов с диабетом. *J Diabetes.* 2016;8(3):398-404. <https://doi.org/10.1111/1753-0407.12309>]
- Chrysant SG. New onset diabetes mellitus induced by statins: current evidence. *Postgrad Med.* 2017;129(4):430-5. <https://doi.org/10.1080/00325481.2017.1292107>

Поступила 18.04.2018