

Уровни в крови пропротеиновой конвертазы субтилизин-кексинового типа 9 (PCSK9) при гипер- и гипохолестеринемии

Ю. И. Рагино, К. С. Астракова, Е. В. Шахтшнейдер, Е. М. Стахнёва, М. И. Воевода
ФГБУ «Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины» (НИИТПМ), г. Новосибирск

Абстракт

Целью исследования было изучение белка пропротеиновой конвертазы субтилизин-кексинового типа 9 (PCSK9) у лиц с гиперхолестеринемией (ГХС), в том числе семейной ГХС, и с гипохолестеринемией (популяционные подвыборки) и поиску его ассоциаций с липидными показателями.

Методы и результаты исследования. Уровень в крови белка PCSK9 определяли методом иммуноферментного анализа, используя тест-системы HumanProproteinConvertase 9/PCSK9 Immunoassay (R&D Systems). Выявлено, что при ГХС, особенно семейной ГХС, уровни белка PCSK9 в крови выше, чем при гипохолестеринемии, причем у женщин выше, чем у мужчин. Гистограмма распределения PCSK9 при ГХС имеет непараметрический характер с медианой 223 нг/мл. Корреляция PCSK9 с уровнем общего холестерина (ХС) особенно с ХС липопротеинов низкой плотности (ЛНП) отражает значимую роль этого белка в регуляции метаболизма ЛНП через влияние на рецепторы к этим частицам.

Ключевые слова: пропротеиновая конвертаза субтилизин-кексинового типа 9, PCSK9, гиперхолестеринемия, семейная гиперхолестеринемия, гипохолестеринемия.

Blood levels of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (pcsk9) in hyper- and hypocholesterolemia

Yu. I. Ragino, K. S. Astrakova, E. V. Shakhshneider, E. M. Stakhneva, M. I. Voevoda
Federal State Budgetary Organization "Institute of Internal and Preventive Medicine", Novosibirsk, Russia

Abstract

The aim of the study was to investigate proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) in subjects with hypercholesterolemia (HCH), including familial HCH, and with hypocholesterolemia (population subsamples) and search its associations with blood lipids levels. Blood level of PCSK9 was determined by ELISA using the test-systems «Human ProproteinConvertase 9/PCSK9 Immunoassay» (R&D Systems). It was revealed that in HCH, particularly familial HCH, PCSK9 levels in the blood is higher than in hypocholesterolemia, and higher in women than in men. Histogram distribution of PCSK9 in HCH is a non-parametric nature of a median 223ng/ml. Correlation of PCSK9 with total cholesterol (CH), and especially with CH of low-density lipoprotein (LDL) reflects an important role of this protein in the regulation of metabolism of LDL by affecting the receptors to these particles.

Keywords: proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, PCSK9, hypercholesterolemia, familial hypercholesterolemia, hypocholesterolemia.

Введение

Гиперхолестеринемия (ГХС) и повышенный уровень холестерина липопротеинов низкой плотности (ЛНП) в крови независимо ассоциируются с ишемической болезнью сердца, являющейся

основной причиной заболеваемости и смертности в мире [13].

Актуальность роли пропротеиновой конвертазы субтилизин-кексинового типа 9 (PCSK9) в отношении метаболизма холестерина (ХС) была продемонстрирована в нескольких исследованиях.

Было выявлено, что гетерозиготные формы специфических миссенс-мутаций PCSK9 вызывают аутосомно-доминантную ГХС [3], избыточная экспрессия PCSK9 у линии мышей с клетками гепатомы человека приводит к снижению содержания рецепторов к липопротеинам низкой плотности (ЛНП) за счет резкого увеличения деградации зрелых рецепторов и их предшественников [9], рекомбинантный человеческий PCSK9, введенный внутривенно мышам, снижает уровень рецепторов к ЛНП в легких, жировой ткани, почках и особенно в печени [14].

Белок PCSK9 секретируется печенью, почками и тонким кишечником и на посттранскрипционном уровне регулирует концентрацию в крови атерогенных частиц ЛНП за счет деградации рецепторов к ЛНП [1, 11, 15]. Установлено, что нормальный диапазон PCSK9 у человека в крови колеблется от 50 до 600 нг/мл [7]. Отмечены незначительные различия в уровнях PCSK9 между мужчинами (608 нг/мл) и женщинами (646 нг/мл) [10]. Концентрация PCSK9 в крови имеет свой суточный ритм с низким уровнем этого фермента в период между 15:00 и 21:00 и ночным его пиком в 04:30, причем амплитуда колебаний не превышает $\pm 15\%$ [12]. Пациенты с аутосомно-доминантной ГХС из-за мутации усиления функции D374Y гена PCSK9 имеют более низкие уровни PCSK9, чем здоровые лица или пациенты с другими молекулярными причинами аутосомно-доминантной ГХС [6].

В 2007 году Alborn W.E. и соавт. выявили положительную ассоциацию между уровнями в крови белка PCSK9 и ХС-ЛНП [4]. Эта ассоциация подтверждена у людей разной этнической принадлежности, включая европейцев, американцев, латиноамериканцев, афроамериканцев, китайцев. Она также наблюдается у пациентов с сахарным диабетом [5]. Сила связи между уровнем циркулирующего PCSK9 и уровнем ХС-ЛНП, по мнению Lakoski S.G. и соавт., является небольшой, так как любое изменение концентрации PCSK9 в крови объясняет только 7% от изменчивости уровней ХС-ЛНП в крови. Уровень циркулирующего PCSK9 также связан с уровнями общего ХС и триглицеридов (ТГ) в крови в больших когортах [8].

В исследовании Мешкова А.Н. и соавт. (2012) на 60 пациентах с клиническим диагнозом «семейная ГХС» и на 29 их здоровых родственниках было показано, что уровень PCSK9 достоверно выше в группе пациентов с семейной ГХС – 258,77 (221,67–299,17) нг/мл, чем в контрольной группе – 193,83 (166,44–220,29) нг/мл, а также что уровень PCSK9 умеренно коррелирует с уровнем общего ХС, ТГ, ХС-ЛНП, фибриногена и слабо коррелирует с возрастом [2].

Несмотря на проведенные исследования, данные об уровнях в крови белка PCSK9 при ГХС и о его корреляциях с липидными показателями малочисленные, особенно в российских исследованиях, и противоречивые. Поэтому настоящее исследова-

ние было посвящено изучению белка PCSK9 у лиц с гипер- и гипохолестеринемией (популяционные подвыборки) и поиску его ассоциаций с липидными показателями.

Материалы и методика исследования

В исследование были включены 113 человек. Первую группу составили 91 человек с ГХС, включая подгруппу пациентов с семейной ГХС (43 человека в возрасте $49,9 \pm 1,8$ года – 32 женщины и 11 мужчин) и подгруппу мужчин из популяционной подвыборки лиц с высоким уровнем ХС (48 мужчин в возрасте $57,1 \pm 1,2$ года), обследованных в рамках международного проекта НАPIEE фонда WellcomeTrust (Великобритания) «Детерминанты сердечно-сосудистых заболеваний в Восточной Европе» (руководители проекта в Новосибирске проф. Никитин Ю.П. и проф. Малютина С.К.). Вторую группу составили 22 мужчины из популяционной подвыборки лиц с низким уровнем ХС (48 мужчин в возрасте $57,1 \pm 1,2$ года), обследованных в рамках проекта НАPIEE. Все обследованные заполняли форму информированного согласия на участие в исследовании.

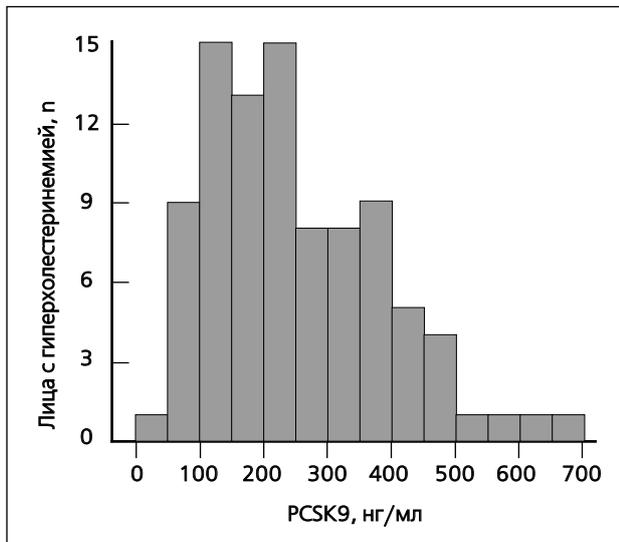
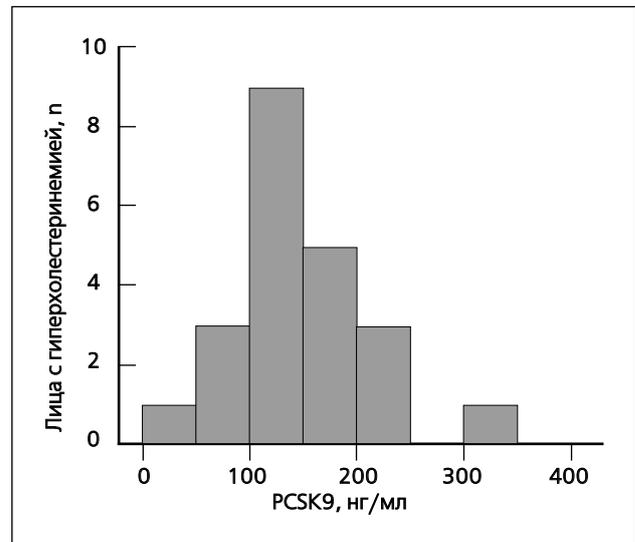
Пробы крови для биохимических исследований забирали однократно из локтевой вены утром натощак через 12 ч. после приема пищи. Уровни липидных показателей в крови (общий ХС, ТГ, ХС липопротеинов высокой плотности, ХС-ЛВП) определяли энзиматическими методами на автоматическом биохимическом анализаторе Konelab300i (Финляндия) с использованием реактивов TermoFisher (Финляндия). ХС-ЛНП рассчитывали по формуле Фридвальда.

Уровень в крови белка PCSK9 определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА), используя тест-системы HumanProproteinConvertase 9/PCSK9 Immunoassay (R&D Systems, USA) на ИФА-анализаторе Multiscan (Финляндия).

Статистическую обработку результатов проводили в программе SPSS for Windows с оценкой для каждой переменной среднего значения (M), стандартного отклонения, стандартной ошибки средней ($M \pm m$ (σ), минимального и максимального значений. Корреляционный анализ проводили с использованием коэффициентов Спирмена и Пирсона. Различия между группами анализировали, применяя независимый T-test и Oneway ANOVA с использованием критерия Даннета. Критерием статистической достоверности был уровень $p < 0,05$.

Результаты исследования

Проведенные измерения концентрации белка PCSK9 в крови у лиц с ГХС (общий ХС $\geq 195,9$ мг/дл, мужчины и женщины с семейной ГХС, мужчины популяционной подгруппы с ГХС) позволили получить гистограмму распределения

Рисунок 1. Гистограмма распределения в крови белка PCSK9 у лиц с гиперхолестеринемией (n = 91)**Рисунок 2.** Гистограмма распределения в крови белка PCSK9 у лиц с гиперхолестеринемией (n = 22)

белка при ГХС (рис. 1). Данные гистограммы свидетельствуют о непараметрическом распределении PCSK9 с медианой 223 нг/мл. У мужчин группы с гипохолестеринемией (общий ХС $\leq 154,0$ мг/дл) гистограмма распределения белка при гипохолестеринемии (рис. 2) свидетельствует о практически параметрическом распределении PCSK9 с медианой 135,5 нг/мл.

Сравнительная характеристика PCSK9 и липидных показателей у лиц с гипер- и гипохолестеринемией представлена в табл. 1. Концентрация белка PCSK9 при ГХС оказалась в 1,7 раза выше, чем при гипохолестеринемии. Уровни общего ХС, ХС-ЛНП, ТГ, ХС-ЛВП в группе ГХС были выше в 2,1; 2,6; 2,0 и 1,2 раза соответственно, чем в группе гипохолестеринемии. Полученные результаты не противоречат результатам исследования Мешкова А. Н. и соавт. (2012) о том, что при семейной ГХС уровень PCSK9 выше, чем в контрольной группе [2].

Более подробные результаты анализа белка

PCSK9 при ГХС представлены в табл. 2. Концентрация белка при семейной ГХС в 2,4 раза выше, чем в популяционной подгруппе ГХС. Поскольку популяционная подгруппа ГХС состояла только из мужчин, а в подгруппе с семейной ГХС были и мужчины и женщины, мы провели сравнение концентрации белка между женщинами и мужчинами с ГХС. У женщин уровень в крови PCSK9 оказался в 1,9 раза выше, чем у мужчин. Полученные результаты отличаются от результатов Мауне J. и соавт. (2007) о том, что различия в уровнях PCSK9 между мужчинами и женщинами незначительные [10].

Корреляционный анализ (табл. 3) показал связи белка PCSK9 с липидными показателями – уровнями в крови общего ХС и ХС-ЛНП. Отрицательная корреляционная связь PCSK9 с возрастом свидетельствует о том, что у лиц среднего возраста уровни в крови PCSK9 более высокие, чем у пожилых лиц. Полученные результаты не противоречат результатам других исследований [2, 4, 8] о том, что уровень

Таблица 1. Сравнительная характеристика PCSK9 и липидных показателей у лиц гипер- и гиперхолестеринемии

Показатели	Гипохолестеринемией (n = 91)					Гипохолестеринемией (n = 22)				
	M	m	σ	Min	Max	M	m	σ	Min	Max
PCSK9, нг/мл	250,4*	14,2	135,3	33,9	650,9	145,3	13,5	63,2	45,5	307,2
ХС общий, мг/дл	308,3*	8,8	83,7	195,9	718,0	144,0	2,0	9,3	109,0	154,0
ХС-ЛНП, мг/дл	203,1*	7,8	73,0	125,7	621,8	77,7	3,0	14,1	50,2	94,4
ТГ, мг/дл	175,0*	12,6	120,6	46,0	788,0	89,1	7,4	35,0	51,0	183,0
ХС-ЛВП, мг/дл	57,9*	1,6	15,1	21,0	113,0	48,5	2,0	9,4	37,0	81,0

Примечание: ГХС – гиперхолестеринемия; ЛНП – липопротеины низкой плотности; ХС – холестерин; ТГ – триглицериды; ХС-ЛВП – холестерин липопротеинов высокой плотности; PCSK9 – пропротеиновая конвертаза субтилизин-кексинового типа 9.

Таблица 2. Сравнительная характеристика PCSK9 у разных групп лиц с ГХС ($M \pm m$ (σ))

Группы лиц с ГХС	PCSK9 (нг/мл)	p
Семейная ГХС, мужчины и женщины (n = 43)	360,7 ± 16,5 (108,3)*	0,001
Популяционная ГХС, мужчины (n = 48)	151,5 ± 8,5 (58,7)	
Мужчины (n = 59)	190,6 ± 13,6 (104,4)	0,001
Женщины (n = 32)	360,6 ± 20,4 (115,7)*	

Примечание: ГХС – гиперхолестеринемия; PCSK9 – пропротеиновая конвертаза субтилизин-кексинового типа 9.

Таблица 3. Корреляционные связи уровней в крови белка PCSK9 с другими изученными показателями

Показатели	PCSK9	
	Коэффициент Пирсона	p
	360,7 ± 16,5 (108,3)*	0,001
ХС общий	0,313*	0,316*
ХС-ЛНП	0,384*	0,333*
ТГ	0,085	0,128
ХС-ЛВП	-0,006	0,046
Возраст	-0,295*	-0,281*
Пол	0,664*	0,596*

Примечание: * – достоверность связи при $p \leq 0,001$; PCSK9 – пропротеиновая конвертаза субтилизин-кексинового типа 9; ХС – холестерин; ХС-ЛНП – холестерин липопротеинов низкой плотности; ТГ – триглицериды; ХС-ЛВП – холестерин липопротеинов высокой плотности.

PCSK9 в крови коррелирует с уровнями общего ХС и особенно ХС-ЛНП, а также данным исследования Мешкова А. Н. и соавт. (2012) о том, что уровень PCSK9 слабо коррелирует с возрастом [2]. Выявленная корреляция PCSK9 с полом свидетельствует, что у женщин в нашем исследовании уровень PCSK9 выше, чем у мужчин, и подтверждает результаты сравнительного межгруппового анализа, представленные в табл. 2.

Таким образом, при ГХС, особенно семейной ГХС, уровни белка PCSK9 в крови выше, чем при гипохолестеринемии, причем у женщин выше, чем

у мужчин. Гистограмма распределения PCSK9 при ГХС имеет непараметрический характер с медианой 223 нг/мл. Корреляция PCSK9 с уровнем общего ХС и особенно с ХС-ЛНП отражает значимую роль этого белка в регуляции метаболизма ЛНП через влияние на рецепторы к этим частицам.

Конфликт интересов

Работа поддержана грантом РФФИ №14-04-01594а.

Список литературы

1. Astrakova K.S., Ragino Yu.I., Shakhtsneider E.V., Voevoda M.I. *Clinical studies of monoclonal antibodies to proprotein convertase subtilisin/kexin type 9. Atherosclerosis. 2015;11(2):43-9. Russian (Астракова К.С., Рагино Ю.И., Шахтшнейдер Е.В., Воевода М.И. Клинические исследования моноклональных антител против пропротеиновой конвертазы субтилизин-кексинового типа 9. Атеросклероз. 2015;11(2):43-9).*
2. Meshkov A.N., Kalinina M.V., Ersbova A.I., Kosenkov E.I., Sbcherbakova N.V., Rozbkova T.A., Masenko V.P., Kubarchuk V.V., Boitsov S.A. *Level of PCSK9 in families of patients with familial hypercholesterolemia. Atherosclerosis and Dyslipidemiae. 2012;1:12-5. Russian (Мешков А.Н., Калинина М.В., Ершова А.И., Косенков Е.И., Щербакова Н.В., Рожкова Т.А., Масенко В.П., Кухарчук В.В., Бойцов С.А. Уровень PCSK9 в семьях пациентов с семейной гиперхолестеринемией. Атеросклероз и дислипидемии. 2012;1:12-5).*
3. Abifadel M., Varret M., Rabes JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, Cruaud C, Benjannet S, Wickham L, Erlich D, Derrÿ A, Villÿger L, Farnier M, Beucler I, Bruckert E, Chambaz J, Chabu B, Lecerf JM, Luc G, Moulin P, Weissenbach J, Prat A, Krempf M, Junien C, Seidah NG, Boileau C. *Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. Nat. Genet. 2003;34:154-6.*
4. Alborn W.E., Cao G., Careskey H.E., Qian YW, Subramaniam DR, Davies J, Conner EM, Konrad RJ. *Serum proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 is correlated directly with serum LDL cholesterol. Clin. Chem., 2007;53(10):1814-9.*
5. Cui Q, Ju X, Yang T, Zhang M, Tang W, Chen Q, Hu Y, Haas JV, Troutt JS, Pickard RT, Darling R, Konrad RJ, Zhou H, Cao G. *Serum PCSK9 is associated with multiple metabolic factors in a large Han Chinese population. Atherosclerosis. 2010;213(2):632-6.*
6. Humphries SE, Neely RD, Whittall RA, Troutt JS, Konrad RJ, Scartezini M, Li KW, Cooper JA, Acharya J, Neil A. *Healthy individuals carrying the PCSK9 p.R46L variant and familial hypercholesterolemia patients carrying PCSK9 p.D374Y exhibit lower plasma concentrations of PCSK9. Clin Chem. 2009;55(12):2153-61.*
7. Lagace TA, Curtis DE, Garuti R, McNutt MC, Park SW, Prather HB, Anderson NN, Ho YK, Hammer RE, Horton JD. *Secreted PCSK9 decreases the number of LDL receptors in hepatocytes and in liver of parabiotic mice. J Clin Invest. 2006;116(11):2995-3005.*
8. Lakoski SG, Lagace TA, Coben JC, Horton JD, Hobbs HH. *Genetic and metabolic determinants of plasma PCSK9 levels. J Clin Endocrinol Metab. 2009;94(7):2537-43.*
9. Maxwell KN, Fisher EA, Breslow JL. *Overexpression of PCSK9 accelerates the degradation of the LDLR in a post-endoplasmic reticulum compartment. Proc Nat Acad Sci. 2005;102:2069-74.*
10. Mayne J, Raymond A, Chaplin A, Cousins M, Kafer N, Gyamera-Acheampong C, Seidah NG, Mbikay M, Chrÿtien M, Ooi TC. *Plasma PCSK9 levels correlate with cholesterol in men but not in women. Biochem Biophys Res Commun. 2007;361:451-6.*
11. Park SW, Moon YA, Horton JD. *Post-transcriptional regulation of low density lipoprotein receptor protein by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 a in mouse liver. J Biol Chem. 2004;279:50630-8.*
12. Persson L, Cao G, Stable L, Sjöberg BG, Troutt JS, Konrad RJ, Gälman C, Wallén H, Eriksson M, Hafström I, Lind S, Dablin M, Amark P, Angelin B, Rudling M. *Circulating proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 has a diurnal rhythm synchronous with cholesterol synthesis and is reduced by fasting in humans. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2010;30(12):2666-72.*
13. Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Adams RJ, Berry JD, Brown TM, Carnethon MR, Dai S, de Simone G, Ford ES, Fox CS, Fullerton HJ, Gillespie C, Greenlund KJ, Hailpern SM, Heit JA, Ho PM, Howard VJ, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Makuc DM, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, McDermott MM, Meigs JB, Moy CS, Mozaffarian D, Mussolino ME, Nichol G, Paynter NP, Rosamond WD, Sorlie PD, Stafford RS, Turan TN, Turner MB, Wong ND, Wylie-Rosett J; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Heart Disease and Stroke Statistics - 2011 Update: a report from the American Heart Association. Circulation. 2011;123(4):18-209.*
14. Schmidt RJ, Beyer TP, Bensch WR, Qian YW, Lin A, Kowala M, Alborn WE, Konrad RJ, Cao G. *Secreted proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces both hepatic and extrahepatic low-density lipoprotein receptors in vivo. Biochem Biophys Res Commun. 2008;370(4):634-40.*
15. Shan L, Pang L, Zhang R, Murgolo NJ, Lan H, Hedrick JA. *PCSK9 binds to multiple receptors and can be functionally inhibited by an EGF-A peptide. Biochem Biophys Res Commun. 2008;375(1):69-73.*