

УДК 612.115.1

© Коллектив авторов

## ФЛОТАЦИОННЫЕ МАСС-СПЕКТРЫ И ПОВЕРХНОСТНЫЙ ЗАРЯД ЧАСТИЦ ЛИПОПРОТЕИНОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ У БОЛЬНЫХ С ГИПЕРЛИПИДЕМИЕЙ ПОСЛЕ ВЫНУЖДЕННОЙ ОТМЕНЫ ЛЕЧЕНИЯ ЛОВАСТАТИНОМ.

*А.Д. Морозкин<sup>1</sup>, А.Б. Сумароков<sup>1</sup>, Н.В. Медведева<sup>2</sup>, А.А. Лякишев<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Российский кардиологический научно-производственный комплекс, МЗ РФ, 121552, Москва, 3-я Черепковская ул., д. 15а, тел.: (095)4146918; факс: (095)4152962

<sup>2</sup>ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, РАМН, 119121 Москва, Погодинская ул., д. 10.

Проанализировано изменение липопротеинового статуса в группе больных с документированным атеросклерозом коронарной артерии и атеромой большой сонной артерии без признаков кальциноза через 4 недели после отмены ловастатина. На фоне лечения статином липидный статус пациентов в обследованной группе больных значительно отличался от такового через 4-е недели после его отмены: уровень общего холестерина (ХС) плазмы был на 40%, ХСлнп - на 70%, ХСлпп - на 60%, триглицеридов - на 20% ниже, ХСлвп - на 7,5% выше; отношение ХСлнп : ХСлвп в среднем составляло 2,3 против 4,1 после отмены препарата. Показано, что чувствительным индикатором изменения липидного состояния больных являются флотационные масс-спектры ЛНП, полученные оригинальным методом скоростной флотации в ультрацентрифуге с последующей экстраполяцией по Van Holde. Для проведения количественного сопоставления и последующей классификации наблюдаемые флотационные масс-спектры ЛНП в диапазоне флотации 12 ~ 32 S (при плотности растворителя  $\rho = 1,170$  г/мл) выделено 4 подфракции с интервалом 5 S. Опираясь на полученные нами ранее данные по электроотрицательности подфракции ЛНП, показано, что флотационные масс-спектры ЛНП на фоне ловастатина свидетельствуют об уменьшении суммарного отрицательного поверхностного заряда частиц ЛНП почти в 1,8 раза в основном за счет снижения содержания подфракций (17-22) и (22-27) S. Однако в подгруппе больных с высоким уровнем триглицеридов уменьшение электроотрицательности ЛНП происходило, благодаря снижению уровня ХСлнп в подфракции (12-17) S, состоящей из самых мелких частиц высокой плотности. Учет сходства липидных показателей и флотационных масс-спектров ЛНП позволяет выделить достаточно однородные группы пациентов со сходной реакцией на терапию ловастатином. Следовательно, предлагаемый анализ может способствовать выработке обоснованной тактики лечения для каждой группы больных.

**Ключевые слова:** липопротеины низкой плотности, подфракции, поверхностный заряд, гиперлипидемия, ловастатин, метаболизм холестерина.

**ВВЕДЕНИЕ.** Снижение уровней общего ХС, ХС липопротеинов низкой плотности (ЛНП) и триглицеридов (ТГ) в плазме положительно коррелирует с уменьшением риска возникновения ишемической болезни сердца (ИБС) и мозга, а при уже имеющемся заболевании способствуют снижению частоты осложнений. Это выражается в улучшении прогноза жизни больных после перенесенного инфаркта миокарда, снижении частоты возникновения новых случаев инфаркта миокарда [1].

Использование для этой цели статинов - ингибиторов 3-гидрокси-3-метилглутарил-коэнзим А-редуктазы получило широкое признание. В клинической практике при любой длительно проводимой терапии достаточно часто возникают проблемы, требующие отмены препарата. Хотя исследования деталей механизма действия статинов ведутся уже свыше 20 лет, эффекты длительного лечения этими препаратами, в том числе возможные проблемы, возникающие после отмены проводимой терапии, установлены не полностью. В частности, изменения липопротеинового статуса после отмены статинов, освещены в литературе недостаточно.

В настоящей работе представлены результаты наблюдений за изменением липидного и липопротеинового состава плазмы крови больных среднего возраста с выраженной гиперлипидемией (общий холестерин выше 6,2 ммоль/л), ставившего целью выяснение возможности стабилизации регрессии атеросклероза каротидных (либо бедренных) артерий, после вынужденного прекращения длительного (трехлетнего) приема ловастатина.

**МЕТОДИКА.** Больные. Обследованная группа составляла 16 человек (13 мужчин и 3 женщины). У все больных, по данным дуплексного сканирования, имелся незначимый (нестенозирующий) атеросклероз периферических артерий; у 15-ти была диагностирована ИБС, в том числе подтвержденная ангиографически - у 14 человек; 13 больных ранее перенесли инфаркт миокарда; 4-ем произведена операция аортокоронарного шунтирования; 8 человек страдали артериальной гипертонией; у одного был сахарный диабет. Возраст больных составлял 50-63 года для мужчин и 39-60 лет для женщин. В качестве контроля использованы липидные показатели и флотационные масс-спектры ЛНП 4-х здоровых мужчин 50 - 52 лет без признаков сердечно-сосудистых заболеваний [2]. В течение трех лет больные регулярно получали гиполипидемический препарат ловастатин (Мевакор) фирмы "MSD". Дозу лекарства подбирали до достижения уровня ХС не выше 5,2 ммоль/л. Средняя суточная доза составляла 65 мг в сутки (от 40 до 80мг) при двукратном приеме. Изменения липидного состава плазмы оценивали накануне и после (через 4 недели) отмены терапии ловастатином.

*Выделение и характеристика липопротеинов.* Кровь отбирали натощак из локтевой вены в пробирку с EDTA (1мг/мл). Плазму отделяли центрифугированием в течение 20 минут при 1000 g и температуре 4°C. Липопротеины разделяли количественно последовательным ультрацентрифугированием на ультрацентрифуге L8 - Beckman (США) в роторе 65 [3,4]. Растворы для выделения липопротеинов содержали 0,196 M NaCl, 0,01% EDTA и 0,05% NaN<sub>3</sub> и соответствующее количество NaBr для получения растворов различной плотности. Плотность растворов контролировали с помощью термостатированного рефрактометра РФ-23 и таблиц соответствия плотности показателю преломления [3].

Общий ХС липопротеинов плазмы, а также ХС во фракциях ЛОНП, ЛНП и ЛВП определяли энзиматическим методом, используя стандартный набор "Cholesterol 50" ("Sigma diagnostics", США); ТГ плазмы определяли на автоанализаторе "Technicon"; белок определяли модифицированным для липопротеинов методом Лоури [16].

*Аналитическое ультрацентрифугирование ЛНП.* Исследование полидисперсности образцов ЛНП (получение флотационных масс - спектров) проводили с помощью аналитической центрифуги модель Е ("Beckman"), снабженной ультрафиолетовой сканирующей оптикой и мультиплексором для одновременного анализа 5-ти образцов методом скоростной флотации. Ультрацентрифугирование проводили в растворе NaBr с плотностью 1,170 г/мл при 20° С и скорости вращения 17000 об./мин, длительность эксперимента составляла 2-2,5 часа, используемая концентрация ЛНП - 0,01% (выбор условий эксперимента обоснован в [5]). Удельная оптическая плотность всех подфракций ЛНП была практически одинаковой и составляла 1,6 при длине волны 280 нм.

### ПОВЕРХНОСТНЫЙ ЗАРЯД ЛНП ПРИ ЛЕЧЕНИИ ЛОВАСТАТИНОМ

Однозначность корреляции между плотностью частиц ЛНП и их константами флотации [5,6] позволили нам применить метод экстраполяции [7] для нахождения точной картины распределения частиц ЛНП по флотационным характеристикам, не нарушенной диффузией. Мы использовали следующее соотношение между истинной плотностью частиц и их константой флотации при плотности растворителя 1,170 г/мл:

$$\rho_{\text{лнп}} = 1,03025 + (28,75 - S_f^{1,170})/300, \quad (1)$$

где  $S_f^{1,170}$  - константа флотации в единицах Сведберга,  $S$ ;  $\rho_{\text{лнп}}$  - истинная плотность ЛНП. Это выражение получено из универсального уравнения для ЛНП-частиц, выведенного нами ранее и устанавливающего связь между константами флотации частиц ЛНП и их плотностью [5]. Для сравнения с данными других авторов, использующих при анализе флотационных свойств растворитель с плотностью 1,063 г/мл,  $S_f^{1,170}$  преобразовывали согласно полученному нами уравнению:

$$S_f^{1,063} = (0,75 \times (S_f^{1,170} - 14)) S \quad (2)$$

В результате преобразования соотношение между истинной плотностью ЛНП -  $\rho_{\text{ист}}$ , рассчитанной нами, и кажущейся плотностью ЛНП -  $\rho_{\text{каж}}$ , получаемой согласно распространенной методике [8], выглядит следующим образом:

$$\rho_{\text{ист}} = 1,167 \times \rho_{\text{каж}} - 0,16 \quad (3)$$

При плотности растворителя 1,170 г/мл собственно ЛНП имеют константы флотации в диапазоне от 12 до 32 S. Материал с константами флотации ниже 12 и выше 32 S (при плотности  $\rho = 1,170$  г/мл) не следует рассматривать при анализе свойств ЛНП.

*Электрические свойства частиц подфракций ЛНП.* Оценка поверхностного электрического потенциала частиц ЛНП препаративно выделенных подфракций осуществлялась с привлечением количественных данных, полученных нами методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) при титровании парамагнитным ионом  $Mn^{+2}$  растворов ЛНП в бессолевой среде [2].

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** *Распределение  $XC_{\text{лнп}}$  по подфракциям и изменение их соотношения под действием ловастатиона.* В таблице 1 приведены основные липидные показатели плазмы крови обследованной группы пациентов на фоне терапии ловастатином и через 4 недели после его отмены. Как и следовало ожидать, после вынужденной отмены препарата уровень  $XC_{\text{общ}}$ ,  $XC_{\text{лнп}}$  и  $XC_{\text{лнпн}}$ , TG имели существенно более высокие значения, чем на фоне терапии ловастатином. Такие показатели, как  $XC_{\text{общ}}$  и  $XC_{\text{лнп}}$  выросли на 40-50%, отношение  $XC_{\text{лнп}} : XC_{\text{лнпн}}$  изменилось с 2,3 до 4,1, т.е., возросло на 75%. Более детально были проанализированы изменения, происходящие во фракции ЛНП. Частицы ЛНП, различаясь по химическому составу, размеру, величине отрицательного электрического заряда поверхности, по флотационным характеристикам, обладают различной способностью взаимодействовать с клеточными мембранами. Именно перечисленные свойства ЛНП определяют в итоге их роль в атерогенезе. Согласно флотационным масс-спектрам, ЛНП плазмы у разных людей представлены набором близких по составу частиц (см. рис. 1), в которых качественный и количественный липидный состав варьирует. Для сопоставления флотационных спектров обследованной группы пациентов реальные флотационные масс-спектры ЛНП были представлены в виде искусственных подфракций с константами флотации  $S_f^{1,170}$  в следующих диапазонах: от 12 до 17 S, от 17 до 22 S, от 22 до 27 S, и от 27 до 32 S. Такое выделение искусственных подфракций оказалось очень удобным для объективного сравнения флотационных масс-спектров ЛНП из разных источников или из одного источника, но при различных условиях медикоментозного диетотерапевтического или иного воздействия. В таблице 2 приведены показатели содержания ХС в выделенных нами подфракциях ЛНП до и после отмены ловастатиона.

Следует отметить, что терапия ловастатином приводила как к существенному изменению абсолютного содержания  $XC_{\text{лнп}}$  (табл.1), так и к

Таблица 1. Содержание холестерина и триглицеридов в плазме крови больных и в липопротеинах до и после отмены ловастатина.

Шифр больного	Состо- яние	ХС <sub>общ</sub> , ммоль/л	Содержание ХС по фракциям липопротеинов ммоль/л			ТГ ммоль/л	$\frac{ХС_{лнп}}{ХС_{лп}}$
			ЛОНП	ЛНП	ЛВП		
16	-	10	2,0	7,0	1,0	2,7	7,0
	+	5,4	0,9	2,9	1,6	2,8	1,8
9	-	9,6	0,6	7,0	2,0	1,3	3,5
	+	4,7	0,2	2,4	2,1	1,2	1,1
10	-	9,3	0,8	7,0	1,5	1,0	4,7
	+	5,3	0,6	3,4	1,3	0,9	2,6
4	-	10,4	2,6	6,6	1,2	1,5	5,5
	+	5,7	0,6	3,8	1,3	1,2	2,9
13	-	8,0	3,2	3,6	1,2	2,8	3,0
	+	8,8	1,9	4,5	1,4	1,2	2,2
14	-	5,3	0,6	3,7	1,0	2,3	3,7
	+	5,2	0,9	3,3	1,0	2,6	3,3
2	-	7,0	1,0	4,9	1,1	1,9	4,5
	+	5,2	0,3	3,6	1,3	1,0	2,8
12	-	7,6	1,7	4,5	1,4	1,7	3,2
	+	4,5	0,6	2,7	1,2	1,1	2,3
3	-	6,3	1,1	4,5	0,7	1,8	5,0
	+	5,1	1,0	3,1	1,0	2,2	3,1
11	-	7,8	3,0	3,8	1,1	1,2	3,8
	+	5,4	0,9	3,3	1,2	1,0	2,8
7	-	6,4	0,3	4,4	1,7	1,5	2,6
	+	4,5	0,5	2,4	1,6	0,7	1,5
1	-	6,5	2,3	3,4	0,8	2,6	4,3
	+	4,2	1,0	2,3	0,9	2,4	2,6
15	-	6,8	2,9	3,3	0,6	1,8	5,5
	+	5,0	1,0	3,2	0,8	2,3	4,0
6	-	5,5	0,4	3,9	1,2	1,9	3,3
	+	3,5	0,3	2,0	1,2	0,7	1,7
8	-	7,0	0,5	4,8	1,7	1,4	2,8
	+	4,6	0,4	2,5	1,7	1,2	1,5
5	-	17,2	3,7	13,0	0,5	1,2	26,0
	+	9,4	1,2	7,4	0,8	-	9,3
норма	-	5,1	0,4	3,5	1,2	0,9	2,9
	+	3,6*	но	но	но	но	но

Примечания: (+) - состояние накануне отмены ловастатина, (-) - состояние через 4-е недели после отмены ловастатина; но - не определяли; \* - данные взяты из работы Tobert J.A., et al. (1982) J.Clin. Invest., 69, 913-919

изменениям соотношения ХС в подфракциях ЛНП (табл.2). Наиболее четкие изменения у большинства больных происходили в подфракциях (17-22) S и (22-27) S, причем именно в этом диапазоне флотации было сосредоточено более половины ХС<sub>лнп</sub>. Однако, у больных 1 и 15 после отмены ловастатина значительная доля ХС<sub>лнп</sub> (до 50%) содержалась в подфракции (12-17) S, тогда как на фоне ловастатина количество ХС<sub>лнп</sub> в этой подфракции снижалось в 2-2,5 раза. В то же время после отмены препарата относительная доля частиц (17-22) S либо несколько снижалась (на 10% для больного N1), либо уменьшалась почти вдвое (у больного N15). По сходству тенденций в перераспределении ХС<sub>лнп</sub> (табл. 2) между подфракциями на

# ПОВЕРХНОСТНЫЙ ЗАРЯД ЛНП ПРИ ЛЕЧЕНИИ ЛОВАСТАТИНОМ

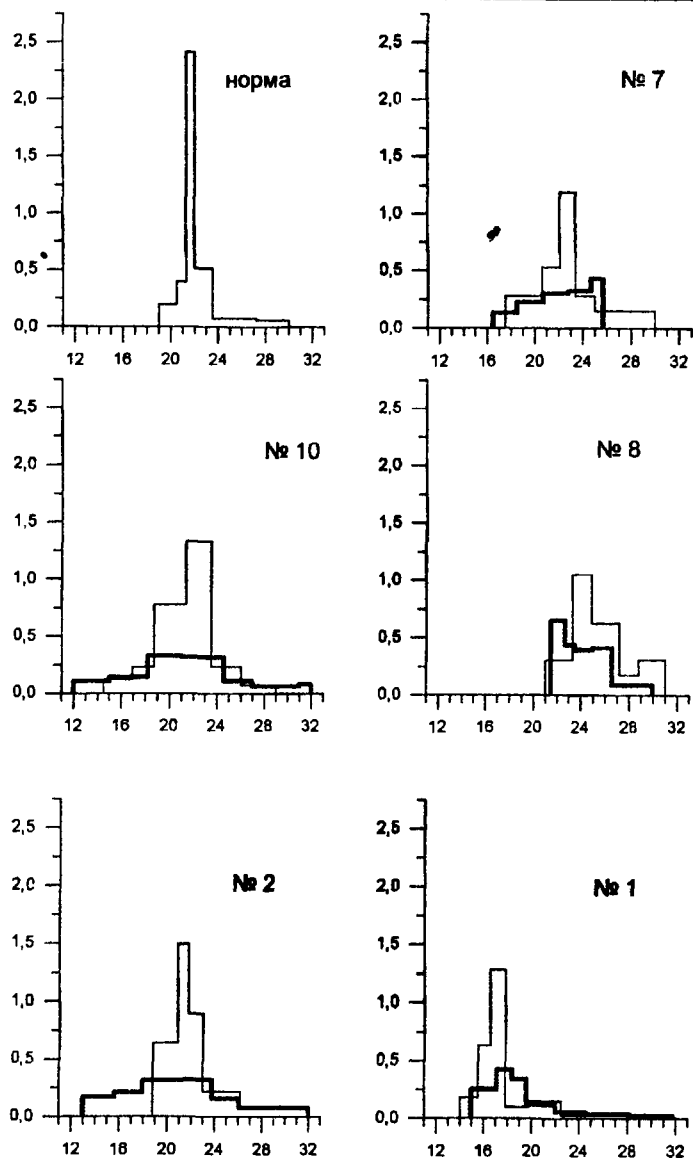


Рисунок 1.

Флотационные масс-спектры ЛНП здоровых доноров и пациентов NN 1, 2, 7, 8 и 10. Тонкие линии - 4 недели после отмены ловастатина; толстые линии - накануне отмены ловастатина. Абсцисса - константы флотации  $S_{170}$  (в единицах Сведберга) для частиц ЛНП при плотности растворителя 1,170 г/мл. Ордината - изменение концентрации ХСЛНП (мМ) по интервалам констант флотации.

фоне близкого липидного статуса, всех обследованных пациентов можно сгруппировать следующим образом: 4, 9 и 10; 7 и 11; 6 и 8; 1 и 15; 2, 3 и 12. Пациенты 13, 14 и 16 по показателям липидов плазмы и реакции на отмену терапии ловастатином сильно отличались друг от друга и от остальных больных. Поэтому мы рассматривали их отдельно. Из данных таблице 2 следует, что на фоне ловастатина количество ХС<sub>лнп</sub> в подфракциях варьирует в пределах, характерных для здоровых доноров (за исключением больного №13). Отмена ловастатина проявлялась не только в увеличении содержания ХС<sub>лнп</sub>, но и в изменении соотношений ХС<sub>лнп</sub> в подфракциях ЛНП по сравнению с нормой.

Таблица 2. Содержание ХС в "искусственных" подфракциях ЛНП

Шифр больного	Состояние	ХС <sub>ЛНП</sub> , ммоль/л			
		(12-17) S	(17-22) S	(22-27) S	(27-32) S
16	-	-	5,24	1,48	0,28
	+	-	2,12	0,70	0,09
9	-	0,53	3,54	2,46	0,48
	+	-	1,32	0,71	0,37
10	-	0,34	3,46	3,06	0,14
	+	0,58	1,41	1,08	0,33
4	-	0,15	3,34	2,47	0,79
	+	0,97	2,04	0,45	0,34
13	-	-	3,22	0,19	0,19
	+	-	3,60	0,69	0,21
14	-	0,34	2,72	0,41	0,23
	+	0,66	1,94	0,48	0,19
2	-	-	2,81	1,72	0,38
	+	0,74	1,31	1,19	0,36
12	-	0,44	2,25	1,54	0,27
	+	-	1,54	1,05	0,11
3	-	0,46	1,93	1,49	0,63
	+	0,40	1,40	1,15	0,16
11	-	-	1,71	1,70	0,38
	+	-	1,54	1,44	0,32
7	-	0,08	1,52	2,46	0,34
	+	0,07	1,05	1,28	-
1	-	1,55	1,53	0,20	0,12
	+	0,53	1,24	0,24	0,29
15	-	1,67	1,05	0,38	0,21
	+	0,58	1,93	0,50	0,20
6	-	-	0,48	2,81	0,62
	+	-	0,64	1,05	0,31
8	-	-	0,31	3,40	1,09
	+	-	0,28	1,98	0,24
5	-	-	2,34	7,80	2,86
	+	0,60	4,44	1,26	1,11
норма	-	-	2,3	0,97	0,21
	+	но	но	но	но

Примечания: больные расположены в порядке уменьшения содержания ХС в подфракции ЛНП (17-22) S для состояния через 4-е недели после отмены ловастатина. Остальные обозначения как в таблице 1.

Наличие значительного количества вариантов изменений в распределении ХС между частицами ЛНП с различной величиной констант флотации может быть обусловлено клинико-биохимическими, генетическими, фармакодинамическими и факторами среды (диета, социально-бытовой фон). Хотя мы не имели возможности осуществить фармакокинетический контроль с определением концентрации препарата, его метаболитов, однако можно ожидать, что к моменту окончания приема ловастатина больными (в нашем случае длительность терапии составила 3 года) общий ХС, ХС<sub>ЛНП</sub> и ТГ находились на уровне устойчивого фармакодинамического равновесия. Показатели общего ХС, ХС<sub>ЛНП</sub> достаточно быстро (на протяжении месяца после отмены препарата) возвращались к

#### ПОВЕРХНОСТНЫЙ ЗАРЯД ЛНП ПРИ ЛЕЧЕНИИ ЛОВАСТАТИНОМ

значениям, которые определялись до начала медикаментозного вмешательства. Поскольку эти показатели были получены в разных лабораторных условиях и с интервалом в 3 года, мы не проводили их прямого сопоставления. Процесс нарастания уровня липидов был постепенным (данные не приведены), и у нас нет каких-либо оснований говорить о т. н. "рикошетном" увеличении уровня липидов после отмены препарата.

С практической точки зрения, очевидно, что уже через месяц после прекращения лечения значимого гиполипидемического эффекта длительно проводимой терапии не прослеживается, но можно рассчитывать на благотворное продолжение нелипидных эффектов статинов. Хотя клинико-биохимическая трактовка различных вариантов изменений полидисперсности ЛНП при отмене ловастатина требует своего уточнения, тем не менее, можно высказать некоторые соображения по поводу их возможного применения.

Анализ последствий отмены ловастатина на масс-спектры ЛНП показал, что у большинства больных содержание ХС<sub>ЛНП</sub> в подфракции (17-22) S наиболее четко коррелировало с общим холестерином ( $r=0,72$ ). Для других подфракций никаких определенных закономерностей в содержании ХС ЛНП в связи с другими липидными параметрами установить не удалось. Основные изменения соотношений происходили в подфракциях (17-22) и (22-27) S. Лишь в двух наблюдениях (больные N1 и 15) максимальные сдвиги были отмечены в подфракции (12-17) S, что по-видимому, связано со значительно повышенным содержанием ТГ в плазме у этих пациентов.

Работы последних лет свидетельствуют о существенной необходимости учета генетического статуса пациентов при оценке нарушений липидного обмена. В частности, в работе [9] показана связь биосинтеза апобелков (апо-В и апо-А1) с типом масс-спектров ЛНП и ЛВП. У пациентов с высоким уровнем ТГ в плазме повышен уровень апо-В, снижен уровень апо-А1 (и ХС<sub>ЛВП</sub>). В спектре ЛНП таких больных преобладают мелкие (более плотные) частицы. Это так называемый В-тип ЛНП. Их формирование детерминировано генетически и наиболее четко прослеживается в возрасте старше 20 лет. Статистический анализ показал положительную корреляцию фенотипа с гомозиготностью по этому признаку с повышенным риском инфаркта миокарда [10] и с документированным ангиографически поражением коронарных артерий [11, 12]. Преобладание мелких частиц ЛНП на фоне повышенного уровня ТГ при терапии ловастатином мы наблюдали у больных N1 и N15: основная доля ЛНП (до 50%) у них после отмены ловастатина была сосредоточена в подфракции (12-17) S, то есть в подфракции, характеризующейся наибольшей плотностью частиц (самых "мелкий" по размеру частиц). Уровень ХС<sub>ЛВП</sub> для этих пациентов был самым низким из обследованной группы - (0,6-1,0) ммоль/л; содержание ТГ - самым высоким (1,8-2,6) ммоль/л.

С помощью уравнения (1) можно перейти от распределения ЛНП по константам флотации при плотности 1,170 г/мл к распределению по плотностям частиц. Используя уравнение (3), мы можем сопоставить наши данные с "кажущимися" плотностями ЛНП, полученными другими исследователями по используемой стандартной методике. Предложенные нами диапазоны флотационных коэффициентов для анализа полученных результатов при пересчете в условия флотации в растворителе с плотностью 1,063 г/мл соответствуют диапазонам значений (0-2,3) S, (2,3-6) S, (6-10) S и (10-13,5) S. Так, по данным Dreon и соавторов [12] значительное количество мелких частиц в подфракциях ЛНП, названных ими ЛНП III и ЛНП IV, характеризовались константами флотации (0-5) S при плотности растворителя 1,063 г/мл. Согласно уравнению (2), при плотности растворителя 1,170 г/мл (условия нашего опыта) это - частицы ЛНП, имеющие константы флотации в диапазоне (14-20,7) S. Следует напомнить, что результаты [12] были получены традиционным методом [8], применение которого для оценки гетерогенности ЛНП обладает более высокой, чем при нашем подходе погрешностью. Однако, по-видимому, и в данной работе, и в работах [9,12] речь

может идти о подфракциях ЛНП с одинаковыми, либо близкими по размеру частицами, и о сходной (или одинаковой) реакции пациентов с повышенным уровнем В-типа ЛНП на гипополипидемическое диетарное воздействие (как в [12]), либо на медикаментозное воздействие (как в нашем конкретном исследовании). Таким образом, анализ флотационных масс-спектров ЛНП может быть использован в качестве самостоятельного средства для тестирования В-типа ЛНП.

*Поверхностный заряд частиц ЛНП разных подфракций.* Одной из важных характеристик частиц ЛНП является их поверхностный заряд, т.к. этот параметр в значительной мере определяет взаимодействие частиц ЛНП с клетками эндотелия [13]. Показано, что модификации, приводящие к увеличению отрицательного заряда частиц ЛНП, увеличивают повреждающее действие ЛНП на сосудистую стенку. Высказано предположение [14], что симвастатин, и, возможно, другие статины, в дополнение к снижению синтеза ХС, могут способствовать частичному предотвращению модификаций частиц ЛНП, увеличивающих их электроотрицательность. Ранее нами было показано, что для подфракций ЛНП различие во флотационных свойствах, связанное с разным соотношением белкового и липидного компонентов, сопровождается различием величины поверхностного заряда [2]. Аналогичные результаты были позднее описаны в работе [15]. Оказалось, что соотношение между величиной поверхностного заряда частиц и их гидратированной плотностью носит экстремальный характер: минимальным (отрицательным) поверхностным потенциалом ( $32 \pm 2$  мВ) характеризовались частицы с истинной плотностью от 1,050 до 1,065 г/мл, что соответствует подфракции (17-22) S. При этом поверхностный потенциал частиц ЛНП подфракции (12-17) S оказался в 1,6 раза выше, подфракции (22-27) S в 1,7 раза выше и подфракции (27-32) S - в 2,5 раза выше, чем у частиц подфракции (17-22) S. Таким образом, зная электроотрицательность подфракций ЛНП, можно достаточно точно судить о среднем электроотрицательном заряде всей фракции ЛНП.

Основываясь на полученные данные и результаты работы [2], рассмотрим поведение характеристики заряда ЛНП на фоне ловастати́на и после его отмены. Опираясь на данные работы [2] и результаты, представленные в таблице 2, можно сказать, что на фоне ловастати́на суммарный отрицательный заряд ЛНП в среднем в  $(1,8 \pm 0,4)$  ниже, чем после его отмены. У больных N1 и N15, у которых масса ЛНП в подфракции (12-17) S после отмены ловастати́на значительно возросла, электроотрицательность этой подфракции увеличивалась в 4 раза. Почти у всех остальных (кроме больных N13 и N16) электроотрицательность всей фракции ЛНП на фоне ловастати́на определялась количеством подфракций (17-22) S и (22-27) S. При этом после отмены ловастати́на возрастание величины суммарного отрицательного заряда за счёт подфракции ЛНП (22-27) S было в среднем в 1,4 раза больше, чем снижение электроотрицательности ЛНП за счёт подфракции (17-22) S. Таким образом, по соотношению между отрицательным зарядом частиц ЛНП и их плотностью [2], а также рассчитанных флотационных масс-спектров ЛНП плазмы обследуемых пациентов можно корректно интерпретировать величину и направленность изменения зарядовой характеристики суммарной фракции ЛНП после какого-либо воздействия (диета, лекарства и т.п.). При этом оценка эффективности того или иного гипополипидемического фактора сводится к анализу того, за счёт какой подфракции ЛНП будет преимущественно изменяться электроотрицательность всей фракции ЛНП. По-видимому, если в основном за счёт уменьшения подфракции (17-22) S, - во многих случаях это нежелательный момент; если за счёт других подфракций ЛНП - это положительный результат.

Некоторые исследователи делают неоправданно категоричный вывод о незначительности влияния статинов на состав ЛНП [12]. По нашему мнению, причина этого часто связана с тем, что используемые методические подходы при аналитическом рассмотрении полученных данных могут содержать систематическую погрешность, от которой нельзя избавиться в рамках применяемого метода. Так, например, привлечение длительного зонального



#### ПОВЕРХНОСТНЫЙ ЗАРЯД ЛНП ПРИ ЛЕЧЕНИИ ЛОВАСТАТИНОМ

центрифугирования липопротеинов в градиенте соли для их фракционирования всегда сопровождается диффузией частиц соседних подфракций, что приводит к их обязательному "взаимозагрязнению" на 20-50%, т.е. препаративное получение индивидуальных подфракций этим методом невозможно. Используемая же нами в данном исследовании аналитическая методика позволяла обойти эту сложность и дала возможность выявить тонкую структуру фракции ЛНП. Так, на примере больных (N7, 11), (N1, 15) и (N6, 8) предложенный нами способ проведения и обработки данных аналитического ультрацентрифугирования, показал что даже для больных с нормальным, либо слегка повышенным уровнем липидов плазмы (или ХС<sub>лнп</sub>), терапия ловастатином оказывается оправданной, т.к. при этом происходит коррекция масс-спектра ЛНП-частиц, указывающая на уменьшение доли и абсолютного количества "атерогенных" частиц ЛНП (наиболее легких и наиболее тяжелых).

Подобный анализ, наряду с определением содержания ХС в разных фракциях липопротеинов, позволяет по-новому рассматривать роль ЛНП в развитии атеросклеротического поражения сосудов на фоне лекарственной терапии.

Авторы приносят благодарность фирме MSD за предоставленный для лечения наблюдаемых больных препарат "Мевакор". Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты РФФИ № 01-04-48504а).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Lipid Research Clinics Program: The Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial Results: parts I and II* (1984) J. Am.Med.Assoc., **251**, 351 -374.
2. *Medvedeva N.V., Morozkin A.D., Valentinova N.V., Scherbakova I.A., Gorshkova I.N., Perova N. V., Lyakishev A.A., Ruuge E.K.* (1991) CV World Reports **4**, 102-108.
3. *Lindgren F.T., Jensen L.C., Hatch F.T.* (1972) In: Blood Lipids and Lipoproteins: Quantitation, composition and metabolism, N.Y., John Wiley and Sons. pp.181-274.
4. *Медведева Н.В., Бушмакина Н.Г., Мишарин А.Ю., Рууге Э.К.* (1987), Биол. мембраны **4**, 849-856.
5. *Morozkin A.D., Medvedeva N.V., Valentinova N.V.* (1989) Studia Biophysica, **129**, 27-36.
6. *Chapman M.J., Laplaud P.M., Luc G., Forgez P., Bruckert E., Gouliner S., Lagrange D.* (1988) J. Lipid Res., **29**, 442-458.
7. *Van Holde K.E., Weischet W.O.* (1978) Biopolymers, **17**, 1387-1403.
8. *Krauss R.M., Burke D.J.* (1982) J. Lipid Res, **23**, 97-104.
9. *Dreon D.M., Fernstrom H.A., Williams P.T., Krauss R.M.* (1997) Atheroscl., Thromb., Vasc. Biol., **17**, 707-714.
10. *Austin M.A., King M.C., Vranisari K.M., Newman B., Krauss R.M.* (1988) Am. J. Hum. Genet., **43**, 838-846.
11. *Campos H., Genest J.J., Jr., Blijlevens E., McNamara J.R., Jenner J.L., Ordovas J.M., Wilson P.W.F., Schaefer E.J.* (1995) Arterioscl., Thromb., **12**, 187-195.
12. *Dreon D.M., Fernstrom H.A., Miller B., Krauss R.M.*, (1994) FASEB, **8**, 121-126.
13. *Ghosh S., Basu M.K., Schweppe J.S.* (1973) Proc.Soc.Exp.Biol.Med., **142**, 1322-1325.
14. *Sanches-Quesada J.L., Otal-Entraigas C., Franco M., Jorba O., Gonzales-Sastre F., Blanco-Vaca F., Ordonez-Llanos J.* (1999) Am.J.Cardiol., **84**, 655-659.

15. Lund-Katz S., Laplaud P.M., Phillips M.C., Chapman M.J. (1998) *Biochemistry* 37, 12867-12874.
16. Markwell MA., Yaas S.M., Bieber L.L., Tolbert N.E. (1978) *Anal. Biochem.* 87, 206-210.

Поступила 12.04.2002

**FLOTATION MASS-SPECTRA AND NEGATIVE SURFACE POTENTIAL OF LOW DENSITY LIPOPROTEIN PARTICLES OF HYPERLIPIDEMIC PATIENTS AFTER EMERGENCY ABOLISHING FOR LAVOSTATIN TREATMENT.**

*A.D.Morozkin<sup>1</sup>, A.B.Soumarokov<sup>1</sup>, N.V.Medvedeva<sup>2</sup>, A.A.Lyakishev<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Russian Cardiology Research Center, 3 rd Cherepkovskaya St. 15 A, 121552 Russia Moscow, phone: (095)4146918; fax: (095)4152962

<sup>2</sup> Orekhovich Institute of biomedical chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Pogodinskaya St. 10, Moscow, 119992 Russia

The lipid status of lovastatin-treated hyperlipidemic patients with documented atherosclerosis of coronary arteries and carotid artery atheroma without signs of calcinosis significantly changed 4 weeks after termination of lovastatin therapy. LDL flotation mass-spectra were shown to be a sensitive indicator of variations of the lipid status. All LDL mass-spectra can be subdivided into four subfractions (from 12 to 32 S at solvent density of 1.170 g/ml and a step of 5 S). Taking into consideration previous data on total electronegative charge of LDL subfractions flotation mass-spectra indicate that lovastatin caused reduction of total negative surface charge of LDL by 1.8-fold mainly due to reduction of (17-22) and (22-27) S. However, in patients with high level of triglycerols reduction of LDL electronegative charge was due to decrease of cholesterol in (12-17) S subfraction. The latter consists of the smallest particles of the highest density. Combined analysis of similarity in lipid parameters and flotation mass-spectra of LDL allows recognizing rather homogenous groups of patients demonstrating similar responsiveness to lovastatin therapy.

**Key words:** low density lipoproteins, mass-spectra, surface electrical charge, hyperlipidemia, hypolipidemic effect of lovastatin.