

ЛП(а) ЛИПОПРОТЕИД И АТЕРОСКЛЕРОЗ

А.В. Тихонов

Научно-исследовательский институт терапии СО РАМН, Новосибирск

Лп(а) липопротеид является одной из атерогенных форм липопротеидов и был открыт более 45 лет назад. Лп(а) — количественный признак, его концентрация находится под полигенным контролем. Уровень концентрации Лп(а) достоверно ассоциирован с риском развития ИБС и нарушением липидного обмена. При концентрации Лп(а) 5–10 мг/дл риск развития ИБС составлял 8–9 %, при концентрации 14–18 мг/дл — 18–25 %, при 21–28 мг/дл — 25–31 %. Уровень концентрации Лп(а) плазмы крови в популяциях Сибири колеблется от 0 до 80 мг/дл. Уровень концентрации Лп(а) от 5 до 18 мг/дл следует считать условной нормой, а уровень 20 мг/дл и выше — границей риска развития ИБС. Уровень ОХС, ХС ЛПНП во всех обследованных популяциях связан с уровнем концентрации Лп(а) плазмы крови: при 30 мг/дл он достоверно выше по сравнению с концентрацией 14 мг/дл, а при нулевой концентрации — достоверно ниже.

Ключевые слова: ЛП(а) липопротеид, ИБС, популяция, концентрация, липидный обмен.

По заключению Всемирной организации здравоохранения, заболеваемость ишемической болезнью сердца (ИБС) и инфарктом миокарда (ИМ) в настоящее время приняла характер эпидемии. Практическая медицина имеет значительные успехи в лечении этих заболеваний, однако профилактические меры еще не достигают желаемых результатов. Отмечено, что в индустриальных и развивающихся странах мира заболеваемость атеросклерозом в последние годы увеличилась почти в 2 раза и даже наблюдается “омоложение”: не редкость в наши дни ИМ в возрасте 20–30 лет, а в возрасте 40–50 лет это стало обычным явлением.

Установлено, что в подавляющем большинстве случаев развитие ИБС и ишемии мозга непосредственно связано с нарушением обмена липидов [Томпсон, 1991].

При детальном изучении липидных спектров пациентов с ИБС практически всегда удается выявить отклонения в обмене липидов или апопротеидов, объясняющие возникновение атеросклеротических изменений в сосудистом русле [Чазов, Смирнов, 1990].

Атеросклероз является постепенным, последовательным процессом, который зависит от находящихся во взаимодействии факторов окружающей среды и наследственности. В развитии атеросклероза важную роль отводят липопротеидам плазмы крови. Биохимические изменения в

спектре липопротеидов длительное время могут быть единственным проявлением атеросклеротического процесса [Fredrickson, 1974; Goldstein et al., 1975; Климов, Никульчева, 1999].

70–80-е годы прошлого столетия ознаменовались серьезными успехами в изучении молекулярно-клеточных механизмов возникновения и развития атеросклероза. Накоплено большое количество данных эпидемиологических исследований, которые подтвердили “липидную гипотезу” возникновения атеросклероза, впервые сформулированную в 1913 году Н.Е. Аничковым и С.Н. Халатовым. Сегодня известно, что концентрация общего холестерина (ОХС) и холестерина атерогенных липопротеидов низкой плотности (ХС-ЛПНП) имеет прямую зависимость со смертностью от сердечно-сосудистых заболеваний и с количеством осложнений атеросклероза в виде инфарктов и инсультов.

ЛИПОПРОТЕИД (а). ОТКРЫТИЕ И МЕСТО В СИСТЕМЕ ЛИПОПРОТЕИДОВ

Лп(а) был открыт Каре Бергом [Berg, 1963], который подробно изучил и описал его. Вначале он предположил, что обнаруженный им компонент плазмы крови человека представляет собой один из генетических вариантов ЛПНП. Однако позднее было установлено, что Лп(а) и ЛПНП разные ЛП, так как относятся к разным классам

антигенов [Berg, 1964a, 1964b, 1968, 1977; Albers, Dray, 1972; Albers, Aladjem, Chen, 1972; Dahlen, Berg, 1976a; 1976b; Dahlen, Berg et al., 1974; 1975]. Используя метод двойной иммунодиффузии, К. Берг ввел классификацию сыворотки крови человека, разделив ее на две группы: Лп(а+) — сыворотка, образующая преципитат с антителами против апо(а), и Лп(а) — сыворотка, не образующая такого преципитата. Он высказал предположение, что этот ЛП наследуется аутосомно-доминантно. После разработки и внедрения количественного метода измерения Лп(а) было показано, что Лп(а) — количественный признак и концентрация его находится под полигенным контролем, возможно с главным генным эффектом для Лп(а) высокой концентрации [Harvie, Schultz, 1970, 1973; Sing et al., 1974; Hasstedt, 1983; 1986; Berg, Dahlen, 1990]. Доказано, что Лп(а) идентичны так называемым “тонущим” пре-β-ЛП, описанным в ряде работ [Rider, Levy, Fredrickson, 1970; Albers, Cabana, Warnick, 1975]. По флотационным характеристикам Лп(а) занимает промежуточное место между ЛПВП и ЛПНП. При электрофорезе Лп(а) обнаруживается между пре-β- и β-фракциями ЛП. Описаны случаи, когда при электрофорезе в ПААГ в плазме крови новорожденных были обнаружены дополнительные полосы в области пре-β- и β-фракции ЛП [Fless, Rolin, Scanu, 1984]. “Тонущие” пре-β-ЛП были выявлены среди пациентов с ГЛП двух районов Норвегии (Grundt, 1976). Затем было установлено, что в описанных выше случаях наблюдали не что иное, как Лп(а) [Berg, 1977; 1990].

СТРУКТУРА ЛП(а) И ЕГО ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Лп(а) — специфический класс ЛП, близкий к ЛПНП с характерными особенностями. Лп(а) имеет плотность в пределах 1,05–1,085 г/мл, электрофоретическую подвижность, характерную для пре-β-бета ЛП. Его можно обнаружить во фракциях ЛПОНП, ЛПНП, ЛПВП. Было найдено, что по электрофоретической подвижности Лп(а) идентичен выявляемой подфракции ЛПОНП, которая встречается у людей с склонностью к сердечно-сосудистым заболеваниям [Dahlen et al., 1972; Dahlen, 1990].

Максимальное количество Лп(а) содержится во фракции с плотностью 1,063–1,120 г/мл. В составе белковой части Лп(а) нет ни апоА, ни апоС, однако присутствует до 15 % альбумина и уникальный апо(а), который находится в комплексе с апоВ100 (до 65 %). Липидный состав Лп(а) несколько напоминает состав ЛПНП, а аминокислотный существенно отличается как от ЛПНП, так и от ЛПВП [Berg et al., 1979]. Одной из характерных особенностей Лп(а) является вы-

сокое содержание углеводов, которые составляют более половины массы частицы Лп(а), благодаря чему обеспечивается их физиологическое влияние в водной среде. Жирные кислоты идентичны по составу с таковыми у ЛПНП, но в отличие от ЛПНП составляют почти половину всех липидов [Simons, Ehnholm, 1970; Ehnholm et al., 1972; Albers, Hazzart, 1974].

Лп(а), как и ЛПНП, характеризуется высоким уровнем содержания эстерифицированного ХС [Desreumaux et al., 1977]. Одним из интересных физических свойств Лп(а) является способность образовывать агрегаты, особенно при высокой концентрации препарата в растворе (больше 5–10 мг/мл). Высказано предположение, что такая агрегация может быть результатом протеолитической лабильности очищенного липопротеида [Jurgent et al., 1977]. Этого же мнения придерживаются и Gaubatz et al. [1983, 1987, 1990], считая, что лабильность Лп(а) и апо(а) возрастает по мере очищения. Электрофорез в ПААГ без ингибиторов протеолитических ферментов и ЭДТА демонстрировал очень высокую гетерогенность Лп(а), а также наблюдалась почти полная потеря антигенных свойств. Добавление ингибиторов сериновых и SH-протеиназ, а также других предохраняющих веществ устраняет этот эффект и сохраняет нативность Лп(а). Это подтверждает, что активные эндогенные протеазы могут отщеплять гидрофильные пептиды из апо(а) белка, оставляя гидрофобную поверхность, что в свою очередь приводит к агрегации частиц [Holston, 1988; Томпсон, 1991].

Интерес к этому необычному липопротеиду был значительно стимулирован сообщениями о связи высокого уровня концентрации Лп(а) с атеросклерозом [Renninger et al., 1965; Berg et al., 1974; Kostner et al., 1981; Тихонов А.В., 1983; Никитин Ю.П., Тихонов А.В., 1983; Dahlen et al., 1986; Rhoads et al., 1986; Armstrong et al., 1986].

Физические свойства Лп(а) были по-разному охарактеризованы разными учеными и значительно отличались в зависимости от способа выделения этого липопротеида и метода его определения.

При длительном хранении с низкой концентрацией соли NaCl Лп(а) ассоциируется в частицу с приблизительным диаметром 420 Å. При хранении Лп(а) в растворах с высокой концентрацией соли этот процесс существенно замедляется. Диаметр частицы Лп(а), определенный электронной микроскопией, составил 255 Å [Simons et al., 1970, 1990]. Использование метода кругового дихроизма (различие окраски в проходящем и отраженном свете) и метода вискозиметрии позволило идентифицировать аллотип Лп(а-) как ЛПНП, но содержащий пропорционально больше ТГ. Различия в массе между

Лп(а⁺) и Лп(а⁻) были рассчитаны посредством потери двух молекул апо(а) из частицы Лп(а). Молекулярная масса, определенная посредством методов седиментации, гель-фильтрации на Bio Cel A-15m, составила 281 kDa. С помощью электронной микроскопии показано, что различия в молекулярной массе подфракций Лп(а) значительны (ранжируется в пределах 300–838 kDa), а молекулярная масса апоВ – 512 kDa [Loscalzo, 1990]. Гетерогенность в размерах частиц Лп(а), видимо, связана с полиморфизмом обеих полипептидных цепей и вариациями входящих в них гликозилатов [Dahlen, Ericson, 1972; Desreumaux et al., 1977; Berg, 1979, 1990].

При электрофорезе в агарозном геле Лп(а) обладает пре-β-электрофоретической подвижностью, подобно частицам ЛПОНП. Такая более высокая подвижность Лп(а) в агарозе по сравнению с ЛПНП объясняется присутствием апо(а) белка, содержащего большое количество сиаловых кислот, которые в свою очередь значительно увеличивают отрицательный заряд частицы, а следовательно, и ее анодную подвижность во внешнем электрическом поле. При замораживании образцов крови Лп(а) диссоциирует при дальнейшем ультрацентрифугировании, поэтому для выделения Лп(а) необходимо использовать свежую плазму крови. Плазма крови Лп(а⁺), хранящаяся при температуре +4 °С в течение нескольких дней, теряет это свойство [Morrisett, Jackson, Gotto, 1977]. Выделение Лп(а) связано с определенными трудностями, обусловленными тем, что количество его в крови невелико: средний уровень Лп(а) составляет около 15–20 мг/дл (уровень ЛПНП составляет 120–300 мг/дл). Причиной образования агрегатов являются протеазы, выделяемые вместе с апополипротеинами, которые отщепляют гидрофильные участки белков, обнажая гидрофобные участки в частицах липопротеида. Это ведет к тому, что процесс ассимиляции, в ходе которого гидрофобные участки экранируются от воды, становятся энергетически выгодными. Добавление ингибиторов протеаз блокирует такую ассоциацию. Поэтому при выделении Лп(а) всегда в кровь добавляют ингибиторы: ЭДТА(трилон Б), фенол-метан-сульфонил-флуорид, азид натрия [Холодова, Чаяло, 1990]. Многие годы Лп(а) определяли как вариант ЛПНП методом иммунодиффузии по Оухтерлони в геле с помощью специфических антисывороток [Berg, 1968]. Затем был предложен специальный метод радиальной иммунодиффузии (РИД) по Манчини [Mancini, 1965], позволяющий измерять количественный уровень Лп(а) в образцах крови [Albers, Adolphson, Hazzard, 1977]. Этот метод основан на использовании моноспецифических поликлональных антител, полимеризованных в агарозном геле. В результате взаимодействия Лп(а)

с антителами в геле образуется кольцо преципитата, диаметр которого пропорционален концентрации Лп(а) плазмы крови. Использование РИД показало, что у всего населения можно измерить уровень Лп(а), и что его уровень в плазме широко варьирует от менее чем 1 мг/дл (на практике часто обозначают такой уровень как “0” или следы) до более чем 100 мг/дл (Albers, 1990). Преимущество РИД заключается в том, что технически он очень прост, не требует дорогостоящего оборудования, отличается хорошей воспроизводимостью, а также позволяет использовать образцы в весьма небольших объемах (Адамова, Афанасьева, Покровский, 1990; Томпсон, 1991).

Частица Лп(а) обладает высокой плотностью (1,09 г/мл). Этот факт заложен в основе выделения Лп(а) с помощью последовательного ультрацентрифугирования (Mills, Zane, Weech, 1984; Lindgren, 1975). Основная масса белков Лп(а) (27–35 % общего пула) представлена комплексом апоВ/ апо(а). Количество апоВ хорошо коррелирует с содержанием ХС ЛПНП. Концевыми аминокислотами его являются остатки серина и глутаминовой кислоты. АпоВ из Лп(а) близок по электрофоретической подвижности и аминокислотному составу к апоВ100 из ЛПНП (Gaubatz, Chari, Nava, 1987). Однако его аминокислотный состав значительно отличается от апоВ из ЛПНП (Berg, Hames, Dahlen, 1979; Gaubatz, Chanem, Guevata, 1990). Он содержит меньше аспартата, изолейцина, фенилаланина и лизина, но в нем много пролина, глицина и треонина (Gaubatz, Chari, Guyton, 1987). По сДНК полная аминокислотная последовательность апоВ100 кодирует 4563 аминокислоты, включая сигнальный пептид из 27 аминокислот. Зрелый белок содержит 4536 остатков, из которых 2336 определены путем секвенирования апоВ пептидов (Yang, Chen, 1986).

АпоВ является кальций-связующим белком (Dashti, Lee, Mok, 1986). В делипидированном состоянии апоВ оказался нерастворимым в воде, что сделало затруднительным определение его первичной структуры. Однако путем клонирования соответствующего гена удалось установить аминокислотные последовательности и доказать, что апоВ48 представляет собой N-концевую часть апоВ100 (первый имеет ограниченное распространение – только в ХМ). АпоВ100 обнаруживается главным образом в Лп(а), ХМ, ЛПОНП, ЛПНП. АпоВ100 и В48 кодируются одним геном, и их раздельный синтез осуществляется, по-видимому, благодаря введению в информационную РНК во время или после транскрипции терминирующего кодона, что происходит в клетках тонкого кишечника, но не в печени (Scott et al., 1988).