



Липопротеин-ассоциированная фосфолипаза А2 как независимый маркер риска сердечно-сосудистых заболеваний

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются основной причиной смерти в мире. По оценкам экспертов, ССЗ уносят жизнь 17,9 миллиона человек ежегодно, что составляет примерно 31% всех смертей в мире, из которых 85% связаны с ишемической болезнью сердца (ИБС), включая инфаркт миокарда и инсульт. Из-за их широкой распространенности и высокой смертности ССЗ стали основной проблемой общественного здравоохранения.

Хотя традиционные факторы риска для этих патологических состояний, к которым относятся гипертензия, сахарный диабет, табакокурение и гиперхолестеринемия, позволили создать модель для прогнозирования риска, до 20% пациентов с ИБС не имеют этих факторов, а 40% имеют только один. Более того, в 35% случаев у больных с ИБС, которые умерли, уровень холестерина липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) был в пределах нормальных значений. Такая стратегия с использованием модели для прогнозирования риска ССЗ является экономически неэффективной и обладает ограниченной прогностической ценностью. Дальнейшие исследования, направленные на улучшение стратификации риска при ССЗ, привели к созданию и внедрению в практическую медицину новых биомаркеров, среди которых высокочувствительный С-реактивный белок (hs-CRP), мозговой натрийуретический пептид (NT-proBNP) и липопротеин-ассоциированная фосфолипаза А2 (Lp-PLA2). В клинических исследованиях было показано, что активность и масса Lp-PLA2 в плазме тесно связаны с атерогенными липидами и сосудистым риском, что послужило основанием для применения данного фермента в качестве биомаркера сердечно-сосудистых заболеваний, а ингибирование его активности может представлять привлекательную терапевтическую стратегию.

Биохимические свойства и механизм действия Lp-PLA2

Липопротеин-ассоциированная фосфолипаза А2, также известная как ацетилгидролаза фактора активации тромбоцитов (PAF-AH), принадлежит к суперсемейству фосфолипаз А2 и является Ca^{2+} -независимой фосфолипазой, которая кодируется геном PLA2G7, состоящим из 12 экзонов и 11 интронов, локализованных на хромосоме 6p21.2-12 (5-7). Lp-PLA2 представляет собой белок с молекулярной массой около 45,4 кДа (величина переменная из-за высокой степени гликозилирования), имеющий 441 аминокислотный остаток. Этот фермент характеризуется способностью специфически гидролизовать фактор активации тромбоцитов (1-0-алкил-2-ацетил-СН-глицерил-3-фосфорилхолин или PAF), а также

глицерофосфолипиды, содержащие короткие и/или окисленные группы жирных кислот в положении sn-2 глицеринового остова. Lp-PLA2 имеет в своем активном центре каталитическую триаду из трех аминокислот серин/аспартат/гистидин (расположенных соответственно в положениях 273, 296 и 351), которая линейно ориентирована и соответствует конформации α/β гидролазы для нейтральных липаз и эстераз, что было подтверждено его кристаллической структурой в растворе. Основными источниками Lp-PLA2 в плазме являются Т-лимфоциты, моноциты/макрофаги, активированные тучные клетки и клетки печени. В крови фермент циркулирует в виде активных форм и с образованием комплексов. Так, 70-80% Lp-PLA2 связаны с ЛПНП в результате специфического взаимодействия белок-белок между N-терминальным остатком Lp-PLA2 и C-терминальным остатком аполипротеина ApoB (ApoB). Остальные 20-30% распределяются между липопротеинами высокой плотности (ЛПВП), липопротеинами очень низкой плотности (ЛПОНП) и липопротеином а (Lp(a)). После окисления ЛПНП короткая ацильная группа в положении sn-2 фосфолипидов становится восприимчивой к гидролитическому действию Lp-PLA2 и продуцирует мощный провоспалительный и проатерогенный медиатор лизофосфатидилхолин (лизо-ФХ), а также окисленные неэтерифицированные жирные кислоты. Лизофосфатидилхолин является мощным хемотактантом для Т-лимфоцитов и моноцитов, индуцирует апоптоз

гладкомышечных клеток, приводит к эндотелиальной дисфункции и стимулирует экспрессию молекул адгезии и цитокинов (рис. 1).

Связь липопротеин-ассоциированной фосфолипазы А2 с риском ССЗ

Интерес к Lp-PLA2 как биомаркеру ССЗ возник после публикации отчета WOSCOPS (West of Scotland Coronary Prevention Study), в котором была показана положительная связь между увеличением концентрации Lp-PLA2 в крови и риском коронарных событий. Один из важных выводов WOSCOPS заключался в том, что в отличие от таких воспалительных биомаркеров, как h-CRP, количество лейкоцитов и фибриногена, только ассоциация Lp-PLA2 с риском коронарных событий не зависела от действия других факторов. Это было подтверждено в других исследованиях, включая MONICA (Monitoring of trends and determinants in cardiovascular disease), Rotterdam Study, Rancho Bernardo и Bruneck. В метаанализе Collaboration такая связь была изучена в 32 проспективных исследованиях, которые включали 79 000 участников (35 945 субъектов, не имеющих в анамнезе сосудистых заболеваний в начале исследования, 32 453 пациента со стабильной ИБС и 10 638 пациентов с диагнозом «острый коронарный синдром»). При анализе учитывалась коррективка по возрасту, полу и факторам липидного и нелипидного риска. У здоровых людей

не обнаружена связь между активностью Lp-PLA2 и коронарными заболеваниями сердца или ишемическим инсультом.

В многочисленных публикациях приводятся данные эпидемиологических исследований, наглядно подтверждающие наличие связи между уровнем Lp-PLA2 и риском возникновения ССЗ. Исследования, в которых оценивалась роль Lp-PLA2 как фактора, влияющего на стратификацию риска ССЗ, представлены в таблице.

В настоящее время определение Lp-PLA2 включено в американские и европейские протоколы оценки сердечно-сосудистого риска для пациентов: ACCF/AHA Guideline for Assessment of Cardiovascular Risk in Asymptomatic Adults (2010), AHA/ASA Guidelines for the Primary Prevention of Stroke (2011), AACE Guidelines for Management of Dyslipidemia and Prevention of Atherosclerosis (2012), European Guidelines on CVD Prevention in Clinical Practice – European Society of Cardiology (2012).

Методы определения Lp-PLA2

Для определения Lp-PLA2 используются два метода – определение концентрации фермента (по массе) и его ферментативной активности. Необходимо отметить, что еще в 2005 г., после многолетних проспективных исследований, тест для измерения массы Lp-PLA2 был официально одобрен FDA (Food and Drug Administration, USA) для оценки риска ССЗ и ишемического инсульта.

Измерение Lp-PLA2 (по массе)

Для определения Lp-PLA2 по массе используется коммерческий набор PLAC[®] Mass Test (diaDexus Inc., South San Francisco, CA). В 2016 г. компания Diazyme Laboratories приобрела все активы diaDexus Inc., поэтому наборы PLAC[®] для пользователей сейчас предлагает Diazyme Laboratories Inc., Poway, California, USA.

Тест основан на принципе иммуноферментного анализа (ELISA, сэндвич-метод) с использованием двух специфических моноклональных антител. Плазму добавляют в лунки микропланшета с анти-Lp-PLA2 моноклональными антителами (2C10) и инкубируют в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем добавляют вторые моноклональные антитела (4B4), меченные ферментом пероксидазой хрена, и инкубируют в течение 180 мин. Лунки промывают и добавляют субстрат тетраметилбензидин. После 20 мин инкубации

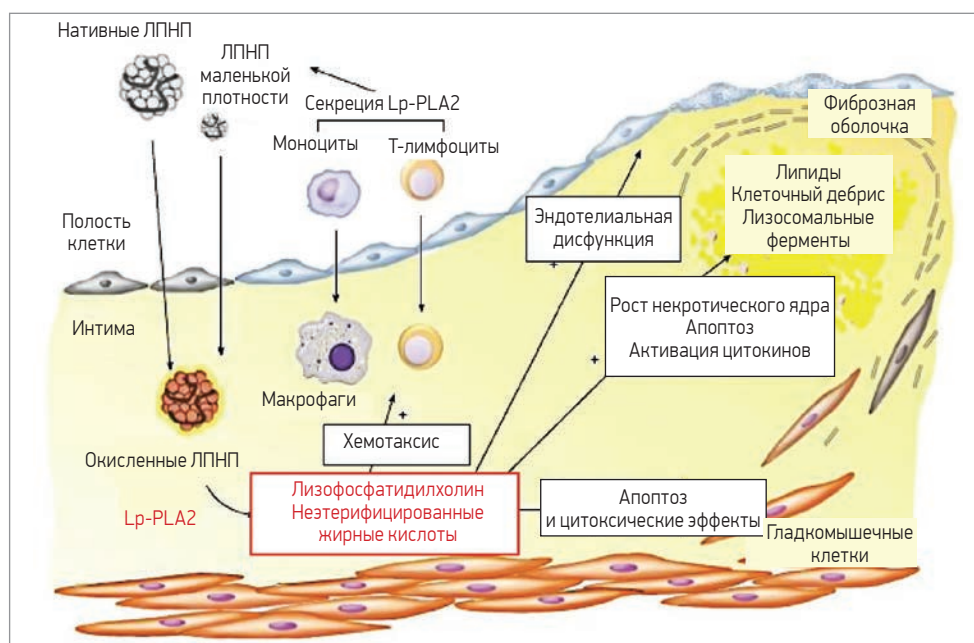


Рис. 1. Механизм действия липопротеин-ассоциированной фосфолипазы А2

Таблица. Оценка роли Lp-PLA2 как фактора, влияющего на стратификацию риска ССЗ в клинических исследованиях						
Исследование	Определение Lp-PLA2	Количество пациентов	Возраст, лет	Длительность, лет	Факторы риска	Риск
Blake et al., 2001 (WHS)	Масса	246	>45	3	Возраст, курение, ЛНП, ЛВП, ИМТ, АГ, СД, ПИКС	Относительный риск
Packard et al., 2000 (WOSCOPS)	Масса	1740	45-70	5	Возраст, курение, фибриноген, лейкоциты, СРБ, САД, ТГ, ЛНП, ЛВП	Относительный риск
Ballantyne et al., 2004 (ARIC)	Масса	1348	45-64	6	Возраст, пол, раса, курение, САД, ЛНП, ЛВП, СД, СРБ	Отношение рисков
Koenig et al., 2004 (KAROLA)	Масса	934	45-64	14	Возраст, САД, ХС/ЛВП, ИМТ, курение, СД, алкоголь	Отношение рисков
Blaiikenberg et al., 2003 (AtheroGene)	Активность	973	>40	–	Возраст, пол, ИМТ, курение, АГ, ЛНП, ЛВП, ТГ	Отношение шансов
Brilakis et al., 2005 (Meyo Heart)	Масса	504	26-76	4	Возраст, пол, курение, АГ, ХС, ЛВП, ТГ, СРБ	Отношение рисков
Home et al., 2005 (IHCS)	Масса	1493	–	–	–	Отношение шансов
Oei et al., 2005 (Rotterdam Study)	Активность	2128	>55	7,2	Возраст, пол, ИМТ, АГ, СД, курение, ЛНП, СРБ, фибриноген, лейкоциты, дигоксин	Отношение рисков
Winkler et al., 2005 (LURIC)	Активность	3148	43-76	–	Возраст, пол, ИМТ, САД, СД, курение, СРБ, лейкоциты, алкоголь	Отношение шансов
Khusevinova et al., 2005 (HELICOR)	Масса	791	40-68	–	Возраст, пол, ИМТ, курение, алкоголь, АГ, СД	Отношение шансов
Persson et al., 2005 (Malmo Diet and Cancer Study)	Активность	5186	–	9,4	Возраст, пол, АГ, СД, ИМТ, курение, липиды, СРБ	Отношение рисков
Koenig et al., 2006 (KAROLA study)	Масса/активность	1051	30-70	4	Возраст, пол, курение, ИМ, СД, ЛВП, ЛНП, ИАПФ, NT-proBNP	Отношение рисков
Gerber et al., 2006 (Olmsted Country)	Масса	241	–	1	Возраст, пол, АГ, ИМТ, СД, курение, ЛНП, ФВ, СРБ	Отношение рисков
Corseri et al., 2006 (THROMBO)	Активность	766	>21	2,2	ИМ, ФВЛЖ, АроВ, ХС, ИМТ	Отношение рисков
Примечания: ИМТ – индекс массы тела; ПИКС – постинфарктный кардиосклероз; ЛНП – липопротеины низкой плотности; ЛВП – липопротеины высокой плотности; ТГ – триглицериды; ХС – холестерин; ИМ – инфаркт миокарда; АГ – артериальная гипертония; СД – сахарный диабет; NT-proBNP – натрийуретический пептид; СРБ – реактивный белок; ИАПФ – ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента; ФВЛЖ – фракция выброса левого желудочка.						

измеряют поглощение при 450 нм, которое прямо пропорционально концентрации Lp-PLA2 в плазме. Концентрация Lp-PLA2 выражается в единицах нг/мл (область измерения 1,2-2000 нг/мл).

Измерение Lp-PLA2 (активность)

Набор PLAC® Test Activity (Diazyme Laboratories Inc.) основан на определении ферментативной активности Lp-PLA2 в сыворотке или плазме. При определении активности Lp-PLA2 происходит гидролиз субстрата 1-миристоил-2-(4-нитрофенил-сукцинила) фосфатидилхолина в положении sn-2 с образованием окрашенного продукта реакции 4-нитрофенола. Скорость образования 4-нитрофенола измеряется спектрофотометрически, а активность Lp-PLA2 рассчитывается по скорости изменения абсорбции. Активность фермента выражается в единицах нмоль/мин/мл (область измерения 10-382 нмоль/мин/мл).

Важно заметить, что измерения Lp-PLA2 по массе и активности представляют частично потенциально разные физиологически значимые виды Lp-PLA2. Метод определения Lp-PLA2 по массе заключается в том, что эпитопы фермента подвергаются воздействию антител в присутствии интактных липопротеинов, тогда как при анализе активности Lp-PLA2 это осуществляется после деструкции липопротеинов детергентом. Поэтому определение Lp-PLA2 по массе представляет собой «экспозиционную» Lp-PLA2, а Lp-PLA2 активность – это общие Lp-PLA2 в плазме.

Хотя в клинических исследованиях было показано, что с риском ССЗ связаны оба параметра, характеризующие Lp-PLA2 (масса и ферментативная активность), в настоящее время только тест для определения Lp-PLA2 (масса) разрешен для клинического применения. Этому тесту присвоен также знак СЕ, подтверждающий соответствие стандартам качества и безопасности Европейского союза.

Референсные значения Lp-PLA2

Повышение концентрации Lp-PLA2 имеет клинический пограничный

уровень – 200 нг/мл, выше которого риски резко возрастают (рис. 2).

Во многих клинических лабораториях рекомендуются следующие референсные уровни Lp-PLA2:

- низкий риск <200 (нг/мл);
- пограничный диапазон 200-235 (нг/мл);
- высокий риск >235 (нг/мл).

Клиническое использование Lp-PLA2: экспертные рекомендации

Для улучшения прогнозирования риска развития ССЗ следует измерять уровень Lp-PLA2 и использовать полученные данные в дополнение к традиционным факторам риска. Измерение уровня Lp-PLA2 рекомендуется проводить у пациентов с умеренным риском (предположительно здоровые лица с двумя или более традиционными факторами риска,

что по Фрамингемской шкале 10-летнего риска соответствует 10-20%), а также у пациентов с высоким риском (установленный диагноз ИБС или с факторами риска, равнозначными ИБС), нуждающихся в более радикальной коррекции стиля жизни и липид-модифицирующей терапии. Клиническим порогом, который дает право на переклассификацию риска, является значение Lp-PLA2 ≥200 нг/мл. Эта величина получена на основе обзора исследований, в которых был показан заметный рост риска наступления сердечно-сосудистых событий у пациентов с превышением данного порога. Таким образом, лица из группы умеренного риска, у которых были определены значения Lp-PLA2 ≥200 нг/мл, реклассифицируются и получают статус пациентов с высоким риском развития ИБС, а пациенты с ИБС

или факторами риска, равнозначными ИБС, и повышенным уровнем Lp-PLA2 переводятся в группу очень высокого риска (рис. 3).

Выводы

ССЗ являются одной из основных причин заболеваемости и смертности в мире. Частота ССЗ в значительной степени может быть уменьшена или сведена к минимуму, если на ранней стадии выявлены факторы риска. Одним из высокоспецифических биомаркеров является липопротеин-ассоциированная фосфолипаза А2, которая считается самостоятельным фактором риска ССЗ.

Преимущества и отличия Lp-PLA2 по сравнению с другими тестами:

1. Увеличение уровня Lp-PLA2 не зависит от традиционных сердечно-сосудистых факторов риска.
2. Lp-PLA2 является ферментом, продуцируемым макрофагами, инфильтрованными в атеросклеротических бляшках, поэтому определение его более специфично по сравнению с другими воспалительными маркерами.
3. Определение Lp-PLA2 помогает выявить скрытый риск сердечно-сосудистых событий, которые могут быть пропущены при использовании стандартных факторов риска (таких как уровень холестерина, артериальное давление, семейный анамнез, табакокурение).
4. Уровень липидов не может дать достаточно информации о состоянии стенки артерии, в то время как Lp-PLA2 отражает этот статус независимо от других сердечно-сосудистых маркеров.
5. Lp-PLA2 специфичен для сосудов и не продуцируется при других воспалительных процессах, в отличие от других воспалительных маркеров (например, hs-CRP).

6. Мониторинг за снижением Lp-PLA2 и ЛПНП в ответ на терапию является лучшим индикатором эффективности лечения по сравнению только с определением ЛПНП.

7. Lp-PLA2 имеет минимальную биологическую вариабельность.

8. По результатам определения Lp-PLA2 можно определить цель и дальнейшую стратегию лечения пациента.

Список литературы находится в редакции.

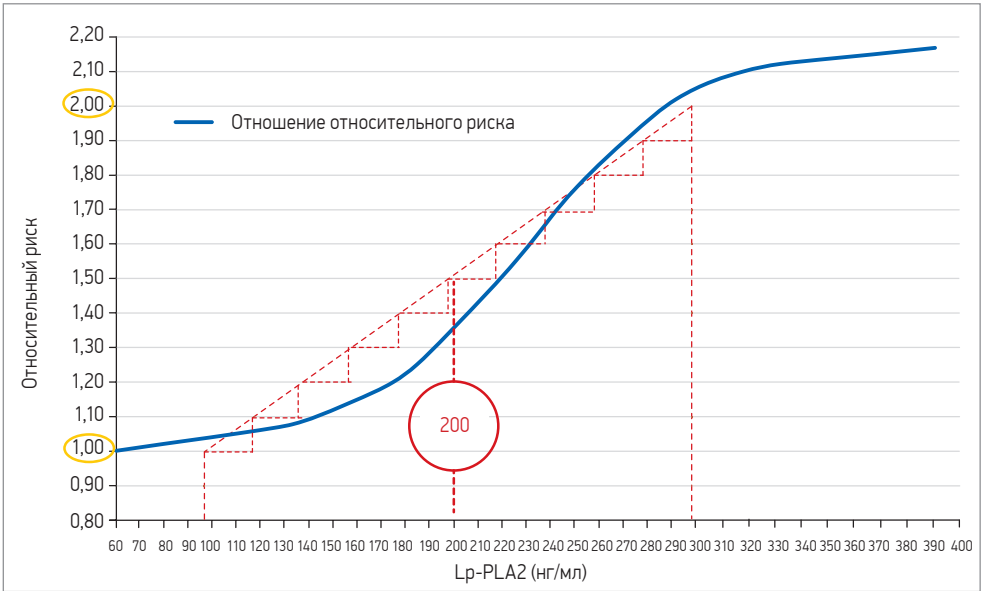


Рис. 2. Ассоциация Lp-PLA2 с риском ССЗ

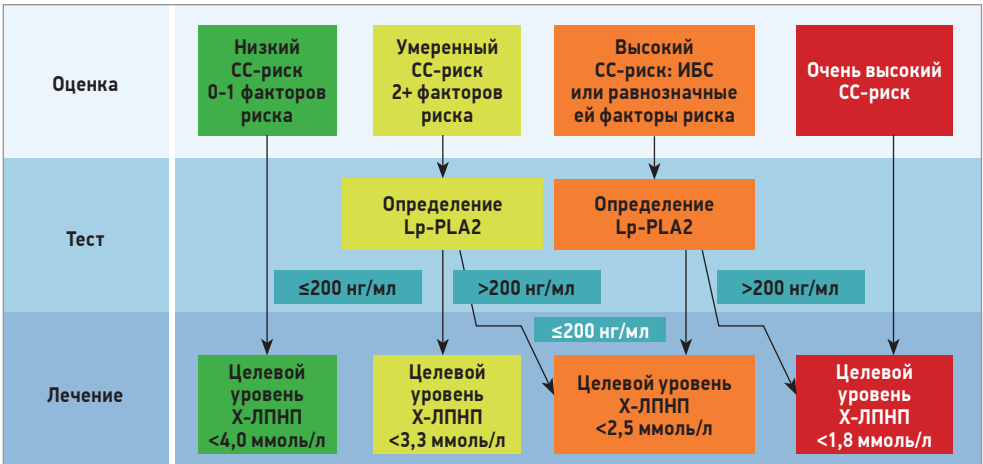


Рис. 3. Алгоритм скрининга Lp-PLA2 для детализации оценки сердечно-сосудистого риска