



Лipoppoteины плазмы крови

Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И.
Мечникова
Кафедра биологической и общей химии

План лекции

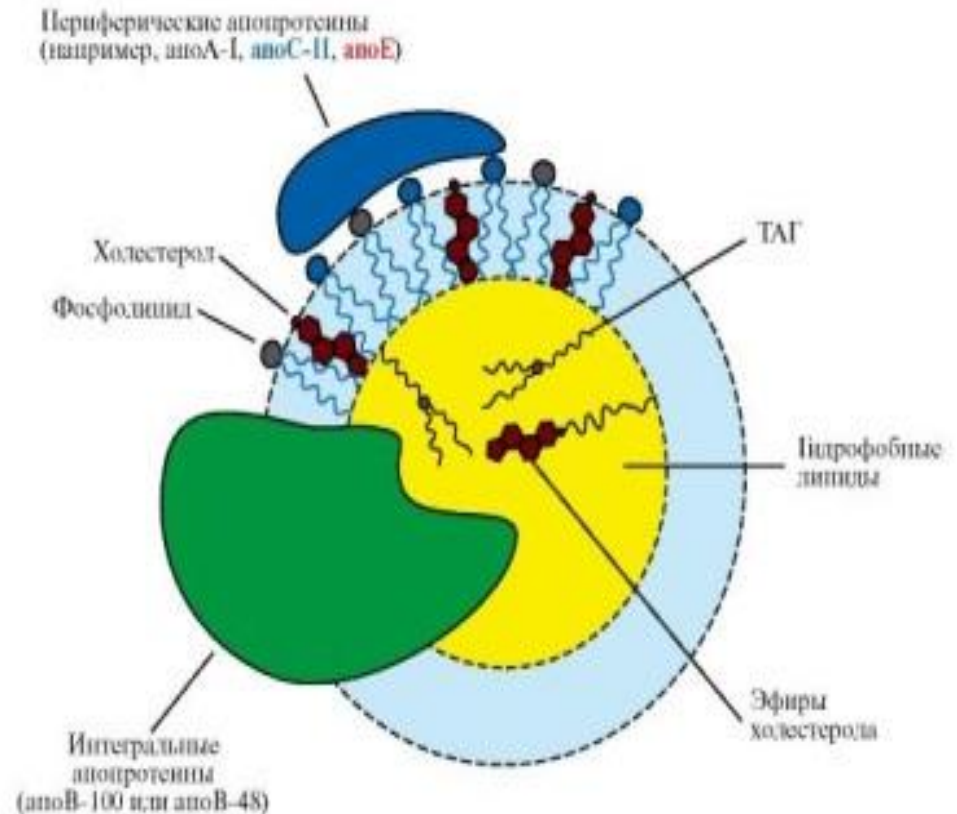
- Липопротеины плазмы крови
- Классификация ЛП
- Аполипопротеины
- Метаболизм ЛП: ХМ, ЛПОНП, ЛПНП, ЛПВП
- Атеросклероз
- Гиполипидемическая терапия
- Диагностика нарушений липидного обмена

Липиды

- Это органические соединения, не растворимые в воде, не могут самостоятельно транспортироваться в крови
- Могут переноситься только в комплексе с белками
- Липопротеины (ЛП) – это транспортные формы липидов в крови
- ЛП переносят жирорастворимые витамины и гормоны

Структура ЛП крови

- Наружный полярный слой формируют гидрофильные головки ФЛ (монослой), белки (интегральные и периферические) и свободный ХС
- Гидрофобное неполярное ядро («жировая капля») образовано неполярными липидами, триглицеридами и эфирами ХС



Методы разделения ЛП лежат в основе их классификации

- Ультрацентрифугирование – основан на разности в плотности ЛП. Зависит от соотношения липиды/белок. В КДЛ используется редко.
- Электрофорез – основан на электрофоретической подвижности ЛП, которая обусловлена наличием ФЛ и белков, несущих заряд. Скорость движения частиц зависит от их заряда и размера. При электрофорезе в геле все ЛП движутся к (+) полюсу: ближе к старту располагаются ХМ, а ЛПВП, имеющие наибольшее количество белков и наименьший размер, удаляются от старта дальше других частиц.

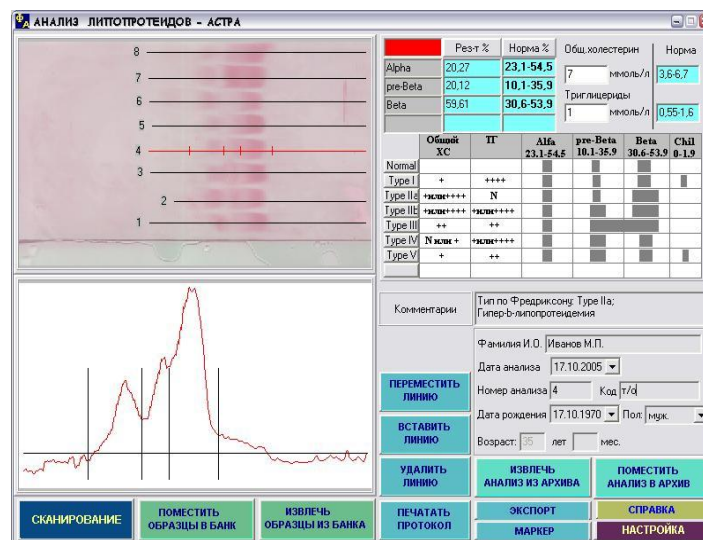
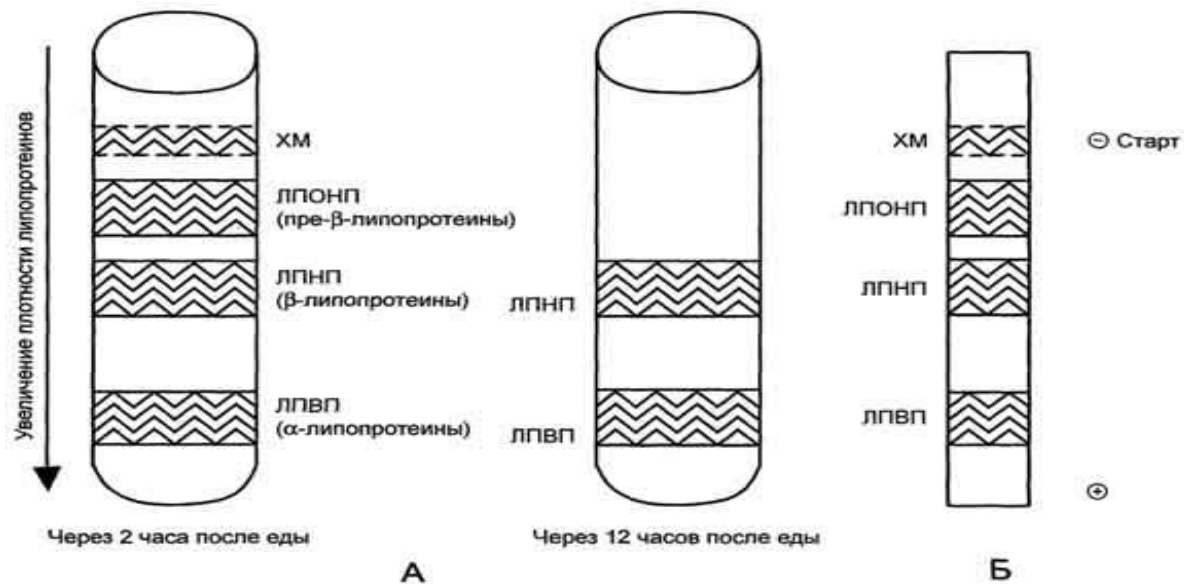
Ультрацентрифугирование

- Метод основан на разности плотности ЛП, который измеряется по способности флотировать (всплывать) при ультрацентрифугировании в растворах с разной плотностью, создаваемой NaCl или KBr.
- 4 основные фракции:

ЛП	Плотность, г/мл	
1. Хиломикроны	< 0,96	ХМ
2. ЛП очень низкой плотности (ЛПОНП)	< 1,006	преβ-ЛП
3. ЛП низкой плотности (ЛПНП)	< 1,063	β-ЛП
4. ЛП высокой плотности (ЛПВП)	> 1,063	α-ЛП

Т.к. плотность частиц зависит от соотношения липид/белок, соотношение уменьшается, уменьшается и размер частиц от ХМ к ЛПВП

Разделение ЛП плазмы крови методом ультрацентрифугирования (А) и электрофореза (Б)



Аполипопротеины (Апо)

- Это белки, входящие в состав ЛП
- Выделяют 5 основных классов: А, В, С, D, Е

Апо	Функции
АпоА-I	Активатор фермента лецитин:холестеринацилтрансферазы (ЛХАТ), которая синтезирует эфиры ХС путем переноса остатка ЖК из 2-го положения лецитина на ХС. ЛХАТ и АпоА-I связаны с ЛПВП. Синтезируется в печени и в кишечнике
АпоВ-48	Лиганд рецепторов, синтезируется в кишечнике, формирует ХМ
АпоВ-100	Лиганд рецепторов, синтезируется в печени, формирует ЛПОНП и ЛПНП
АпоСII	Активатор липопротеинлипазы (ЛПЛ) Мембраносвязанный фермент на поверхности эндотелия различных тканей, гидролизует ТГ хиломикрон и ЛПОНП. Для его работы необходим гепарин, АпоС-II, синтезируется в печени
АпоD	Транспорт ЭХС между ЛП в крови, синтезируется в печени
АпоЕ	Лиганд рецепторов, синтезируется в печени

Группы липопротеинов

	Состав, %	Функция	Место образования	Плотность, диаметр частиц	Основные аполиП
ХМ	<i>Б-2, ФЛ-3, ХС-2, ЭХС-3, ТАГ-85</i>	Транспорт из клеток кишечника экзогенных липидов	Эпителий тонкой кишки	0,92-0,98 г/мл >120 нм	В-48, С-II, Е
ЛПОНП	<i>Б-10, ФЛ-18, ХС-7, ЭХС-10, ТАГ-55</i>	Транспорт липидов, синтезируемых в печени	Клетки печени	0,96-1,00 г/мл 30-100 нм	В-100, С-II, Е
ЛППП	<i>Б-11, ФЛ-23, ХС-8, ЭХС-30, ТАГ-26</i>	Промежуточная форма превращения ЛПОНП в ЛПНП	Кровь		В-100, Е
ЛПНП	<i>Б-22, ФЛ-21, ХС-8, ЭХС-42, ТАГ-7</i>	Транспорт ХС в ткани	Плазма крови (из ЛПОНП)	1,00-1,06 г/мл 21-100 нм	В-100
ЛПВП	<i>Б-50, ФЛ-27, ХС-4, ЭХС-16, ТАГ-3</i>	Транспорт ХС из тканей в печень	В клетках печени-ЛПВП-предшественники	1,06-1,21 г/мл 7-15 нм	А, С-II, Е

Метаболизм ЛП. Хиломикроны

- ХМ формируются в стенке кишечника, несут **экзогенные** липиды в печень
- Состав ХМ: 88% ТГ, 4% ХС и ЭХС, 1-2% белки (**апоВ-48**, С, Е, А)
- Самые крупные и легкие ЛП, неустойчивы, секретируются в лимфу, затем в кровь.
- от ЛПВП получают апоС и Е

Хиломикроны

- Взаимодействие ХМ с ЛПЛ тканей приводит к потере до 90% ТГ, ХМ значительно уменьшаются в размерах, теряют сродство к апоС, который возвращается на ЛПВП, и превращаются в остаточные или **ремнантные** частицы (РЧ), богатые ХС.
- РЧ захватываются печенью с помощью рецептора к апоЕ (рецептор опосредованный эндоцитоз)
- ХМ переносят ТГ в основном в жировую ткань, где ЛПЛ в 10 раз активнее, чем в мышцах.
- $T_{1/2}=10-15$ мин.
- При наследственной недостаточности ЛПЛ или дефекте в апоС-II наблюдается гиперхиломикронемия – гиперлипопротеинемия I типа по классификации гиперлипидемий по Фредриксону (редкий тип) – не приводит к атеросклерозу

ЛПОНП

- Синтезируются паренхиматозными клетками печени
- Переносят **эндогенные** липиды (в первую очередь ТГ и ХС из печени в другие ткани)
- Состав ЛПОНП: 50% ТГ, 20% ХС и ЭХС, 10% белки (**апоВ-100**, С, Е, D)
- Взаимодействие с ЛПЛ приводит к потере ТГ и апоС и образованию ремнантных ЛПОНП (ЛППП)
- В образовании ЛПНП участвуют ЛПВП, передавая остаточным ЛПОНП ЭХС и забирая свободный ХС
- $T_{1/2}=2-4$ часа
- ЛПОНП значительно повышаются в крови больных с дислиппротеинемиями IIb, IV и V типов. Природа генетических дефектов до сих пор неясна.

ЛПНП

- Образуются в плазме крови из остаточных ЛПОНП
- Состав ЛПНП: 10% ТГ, 55% ХС и ЭХС, 20% белки (апоВ100, Е, D)
- $T_{1/2}=2,5$ дня
- ЛПНП, как и ЛПОНП, переносят ХС из печени в ткани
- ЛПНП захватываются тканями рецептор-опосредованным эндоцитозом по механизму интернализации через рецептор к апоВ-100, Е

Свободный ХС в клетке

- 1) Реэтерифицируется микросомальным ферментом ацилКоА-холестерин-ацилтрансферазой (АХАТ) и, таким образом, запасается в виде олеата
- 2) Используется для построения мембран и синтеза стероидных гормонов
- 3) Угнетает синтез эндогенного ХС, ингибируя ГМГКоА редуктазу (по механизму обратной связи)
- 4) Угнетает синтез апоВ, Е рецептора (снижение транскрипции соответствующего гена)

Печень – основное место катаболизма ЛПНП (70%), где активность ГМГ-КоА-редуктазы обратно связана с экспрессией рецептора к апоВ, Е

АпоВ, Е

- Структура апоВ, Е рецептора детально изучена. Известно >300 мутаций этого белка (IIa гиперлипидемия по Фредриксону).
- При недостаточности взаимодействия апоВ, Е рецептора с ЛПНП наблюдается повышение продолжительности циркуляции ЛПНП, что способствует их модификации (перекисное окисление, гликозилирование) и, следовательно, повышение риска развития атеросклероза

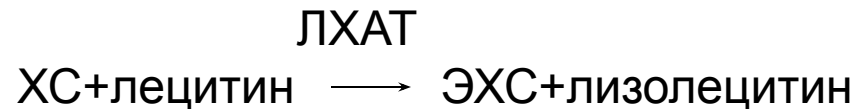
- Основную роль в деградации богатых ХС ЛП (ремнанты ХМ, ЛППП и ЛПНП) играют апоВ-100, апоЕ и их рецепторы
- Нарушение в структуре этих 4-х белков в результате наследственных заболеваний или иных причин приводят к гиперхолестеринемии – одного из важных факторов развития атеросклероза
- ЛПОНП, ЛППП, ЛПНП и ремнанты ХМ относятся к **атерогенным** ЛП, а их повышение в крови к гиперлипопротеинемиям атерогенного характера

ЛПВП

- Антиатерогенные ЛП
- Синтезируются в печени и в кишечнике
- Состав ЛПВП: 10% ТГ, 30% ХС и ЭХС, 45% белки (апоА, С, Д, Е)
- 90% всех белков – это апоА-I и А-II
- Очень сильный акцептор свободного ХС, благодаря наличию ЛХАТ и апоА-I

Основная роль ЛПВП

1. Забирают избыток ХС из клеток различных тканей и с поверхности других ЛП (реакция с **ЛХАТ**)



2. Снабжают белками и ЭХС ЛП, повышая их стабильность
3. Оказывают антиоксидантное действие на ЛПНП, используя для этерификации ХС не свой лецитин, а лецитин ЛПНП, жирная кислота которого часто уже подвергнута перекисному окислению
4. ЛПВП могут захватывать ХС из макрофагов, способствуя рассасыванию липидных полосок, самой ранней формы атеросклеротического поражения сосудов

Механизм действия ЛПВП - обогащенные ХС ЛПВП направляются в печень, где деградируют

Атеросклероз

- Дегенеративное заболевание сосудов
- Сложный многоэтапный патологический процесс, поражающий внутреннюю оболочку крупных и средних артерий
- В настоящее время популярна теория, в соответствии с которой АС рассматривается как реакция на повреждение сосудистой стенки (эндотелия)
- Под повреждением подразумевается не механическая травма, а его **дисфункция**

Дисфункция эндотелия



- Проявляется повышением проницаемости и адгезивности, увеличением секреции прокоагулянтных и сосудосуживающих факторов
- Дисфункцию эндотелия могут вызвать:
 - Гемодинамические факторы (АГ)
 - Токсичные соединения (компоненты табачного дыма)
 - Инфекционные агенты (вирус герпеса)
 - Иммунные комплексы
 - Измененный уровень гормонов (адреналин повышен, инсулин снижен)
 - Избыток гомоцистеина
- Но самый важный **гиперхолестеринемия**
ОХС > 5,2 ммоль/л (референтный интервал 3,4-5,2 ммоль/л)

- В результате дисфункции эндотелия возникает избыточная инфильтрация интимы ЛПНП, активируются процессы их модификации и развивается воспалительная реакция
- За модифицированными ЛПНП (мЛПНП) устремляются моноциты и Т-лимфоциты крови
- Моноциты дифференцируются в макрофаги (МФ)
- Задача МФ – захват мЛПНП с их последующей деструкцией

- Однако неконтролируемый захват ЛП через «скевенджер-рецепторы» МФ приводит к накоплению большого количества ЭХС и ХС и перерождению МФ в пенистые клетки, которые дают начало **липидным полоскам** – I-ой морфологической стадии атеросклеротической бляшки
- МФ секретируют БАВ, включая хемокины, митогены и факторы роста, которые стимулируют миграцию из медиа в интиму гладкомышечных клеток и фибробластов, их пролиферацию и синтез соединительной ткани

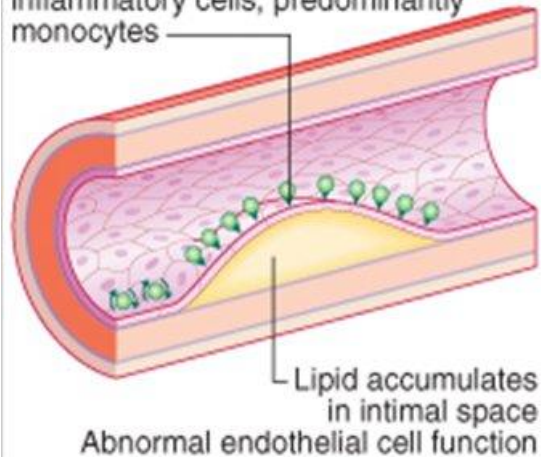
- Вокруг зоны накопления липидов и частичного некроза пенистых клеток развивается соединительная ткань и происходит формирование **фиброзной атеросклеротической бляшки** (желтая бляшка) – этот процесс длительный - долгие годы
- Желтые или ранимые бляшки, имеющие очень тонкую эластичную фиброзную оболочку не вызывают сужения сосудов, но могут быть легко повреждены как гемодинамическими факторами (перепады давления, сужение, растяжение сосудов), так и протеиназами клеток внутри бляшки

- Нарушение целостности фиброзной капсулы приводит к контакту ее содержимого с тромбоцитами и немедленному формированию тромба, что может привести к **ишемии** сердца, мозга, почек и даже к внезапной смерти
- На поздних стадиях развития фиброзные бляшки представляют собой плотные ригидные образования, имеющие прочную соединительнотканную капсулу и содержащие относительно мало липидов и много **фиброзной ткани** (белые бляшки). Они вызывают значительное сужение сосудов

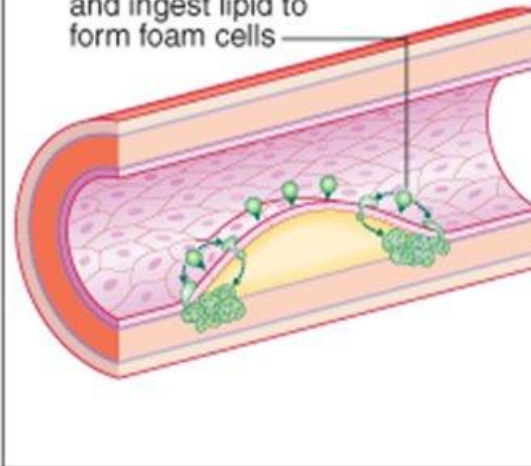
- 
- 
- Таким образом, целью гиполипидемической терапии является предупреждение образования желтых ранимых бляшек

Early atherosclerosis

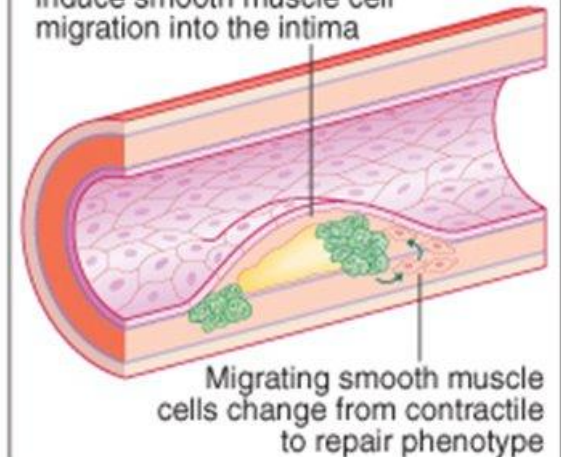
Activated endothelial cells express adhesion molecules and recruit inflammatory cells, predominantly monocytes



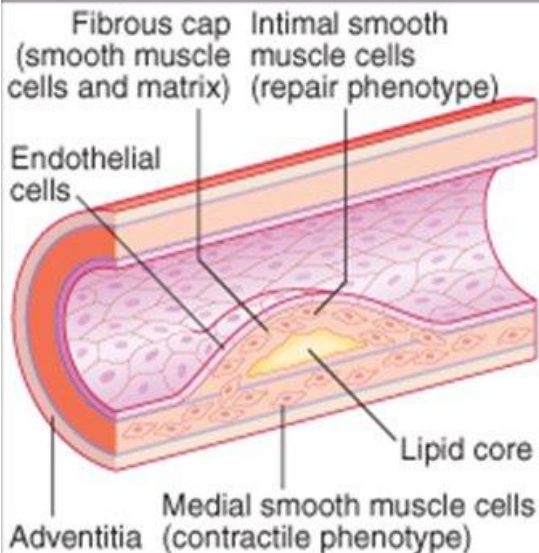
Monocytes migrate into intima, differentiate into macrophages and ingest lipid to form foam cells



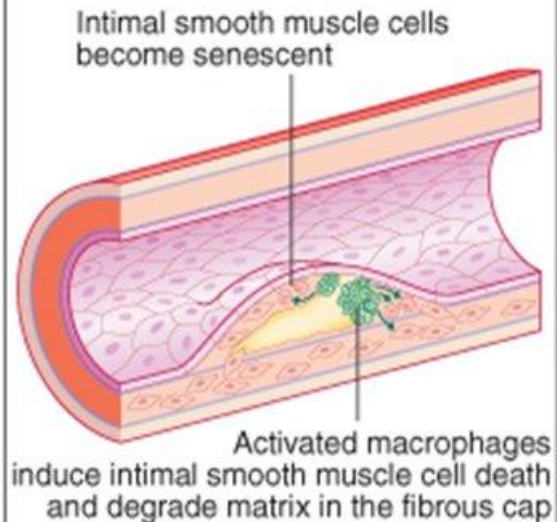
Cytokines and growth factors produced by activated macrophages induce smooth muscle cell migration into the intima



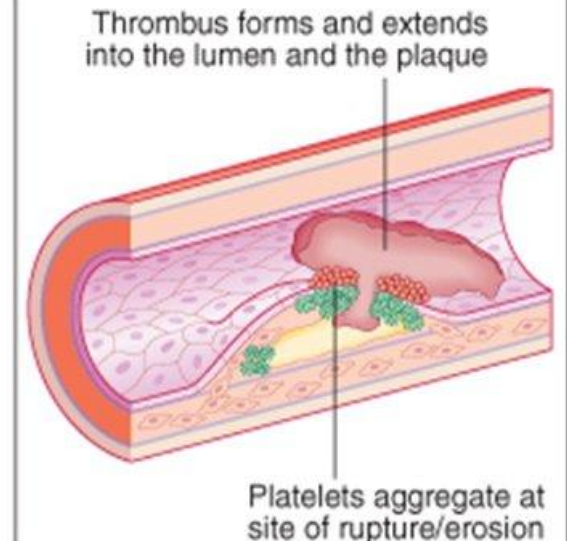
Stable atherosclerotic plaque



Advanced atherosclerosis



Unstable coronary artery disease



Соотношение ЛПОНП, ЛПНП и ЛПВП

Атерогенные факторы

- ЛПОНП и ЛПНП $< 2,59$ ммоль/л
- Транспортируют ХС из печени в ткани

Антиатерогенные факторы

- ЛПВП $> 1,68$ ммоль/л
- Транспортируют ХС из тканей в печень, где ХС превращается в желчные кислоты

**Важно соотношение между ЛПОНП, ЛПНП и ЛПВП!
Если соотношение уравновешено, то атеросклероз не развивается**

Формула расчета коэффициента атерогенности

предложил акад. АМН СССР Климов А.Н. (1920-2011)

$$K_A = \frac{\text{ОХС} - \text{ЛПВП}}{\text{ЛПВП}} \leq 3$$

$$K_A = \frac{\text{ЛПОНП} + \text{ЛПНП}}{\text{ЛПВП}} \leq 3$$

- ХМ-маркерный белок - апоВ48 .
- ЛПОНП – пре-β-липопротеины маркерный белок апоВ₁₀₀ .
- ЛПНП - β липопротеины маркерный белок апоВ₁₀₀.
- ЛПВП α-липопротеины маркерный белок апоА.

Факторы, влияющие на лабораторные показатели липидного обмена

Этап	Особенности исследования
Преаналитический	Кровь на исследование берется утром, натощак Алкоголь, диета, лекарственные препараты Условия забора крови (наложение жгута) Хранение пробы
Аналитический	Иктеричность, гемолиз
Постаналитический	В динамике оценивать результаты исследования в одном типе пробы крови (сыворотка, плазма) Однократное исследование непоказательно – значительные индивидуальные колебания уровня ХС и его фракций, ТГ

Индивидуальные колебания показателей липидного обмена

Показатель	Внутрииндивидуальная вариация, %		Межиндивидуальная вариация, %
	В течение суток	Изо дня в день	
ХС	±2,4	4,2 – 11,8	11,0 – 27,0
ЛПВП	±3,5	4,1 – 9,1	27,0 – 38,0
ЛПНП	±5,1	5,2 – 17,9	До 33,0
ТГ	15,3 – 31,0	8,0 – 45,0	27,8 – 46,0

Влияние лекарственных средств (ЛС) на показатели липидного обмена

ЛС	ХС	ЛПНП	ЛПВП	ТГ
Тиазиды	Возрастает	Возрастает	Варьирует	Возрастают
Фуросемид	Возрастает	Возрастает	Снижается	Возрастают
β-адреноблокаторы	Возрастает	-	Снижается	Возрастают
Симпатолитики	Снижается	-	-	Снижаются
Инсулин	-	Снижается	Возрастает	Снижаются
Сульфаниламочевина	-	-	Возрастает	Снижаются
Бигуаниды	Снижается	-	-	Снижаются
Ибупрофен	Возрастает	-	-	-
Эстрогены	Снижается	Снижается	-	Возрастают

Гиполипидемическая терапия

□ **Статины**

□ Фибраты

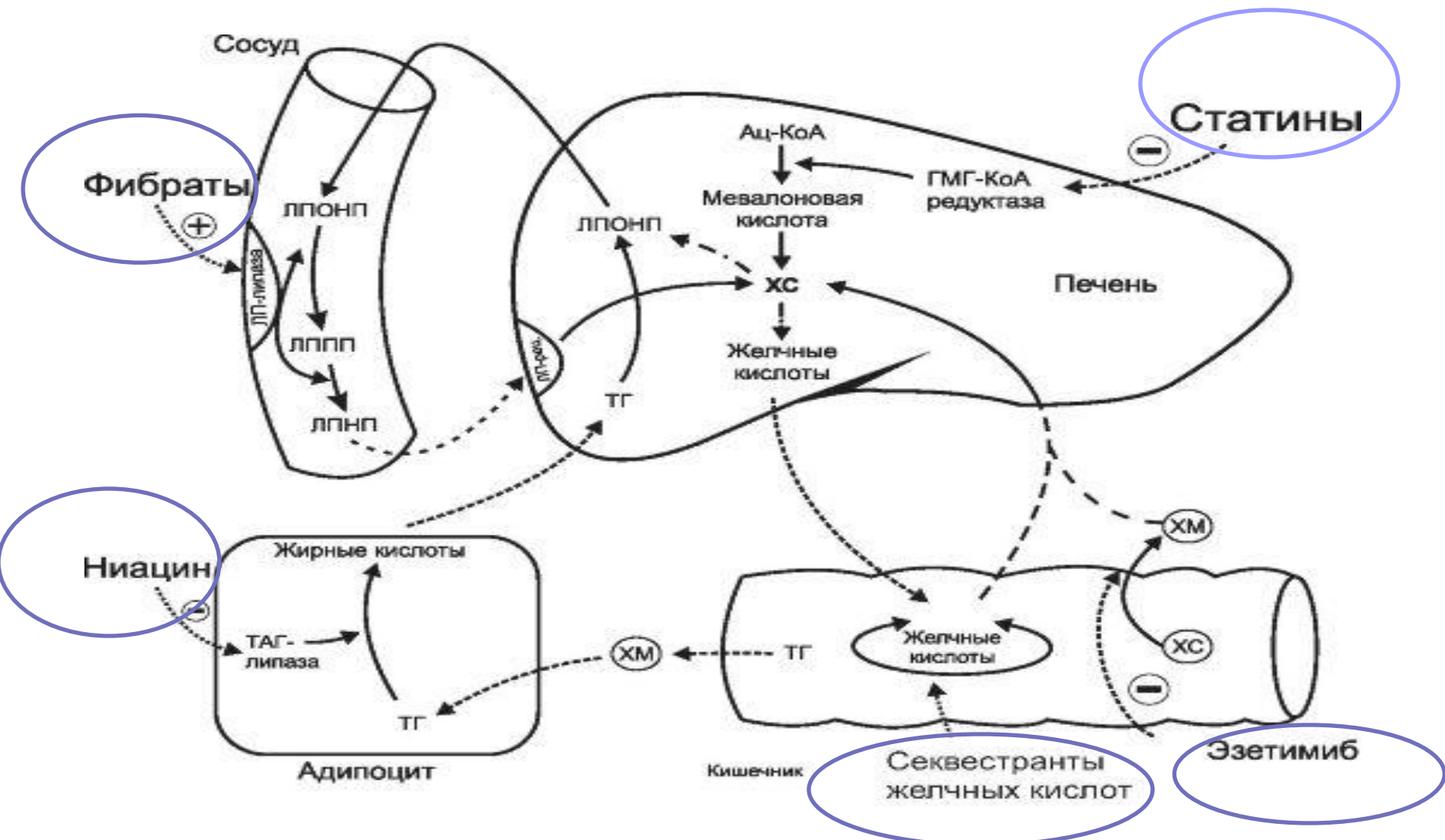
□ Никотиновая кислота

□ Омега-3 ПНЖК

□ Секвестранты желчных кислот

□ Ингибитор кишечной абсорбции холестерина
(эзетимиб)

Механизмы действия гиполипидемических препаратов



Статины

- Механизм действия – угнетают активность фермента синтеза ХС - ГМГ-КоА-редуктазы
- В результате снижения пула ХС в печени повышается активность В-, Е-рецепторов гепатоцитов, которые захватывают из крови ЛПНП;
- ХС снижаются на 30-45%; ЛПНП снижаются на 20-25%; ТГ снижаются на 10-20%; ЛПВП повышаются на 5-10%

Эффективность

- ХС
 - ЛПНП
 - ТГ
 - ЛПВП
- Определять исходно и через 4-6 недель
- 1 раз в 3 месяца – на первом году терапии
 - 1 раз в 6 месяцев – в дальнейшем

Безопасность

- АЛТ
 - АСТ
- Исходно и регулярно
- КФК
 - миоглобин
- При подозрении на миопатию, миалгию, рабдомиолиз

Фибраты

Молекулярный механизм через активацию транскрипции генов PPAR
Усиливают катаболизм ЛПОНП благодаря **повышению активности липопротеинлипазы**

Угнетение синтеза ЛПНП и усиление выведения ХС с желчью

Понижают уровень свободных жирных кислот в плазме крови

ТГ снижаются на 20-50%; ЛПНП снижаются на 10-15%

Эффективность

- ТГ
- ХС
- ЛПВП
- ЛПНП

Контроль
каждые 2-3
месяца

Безопасность

- **АЛТ, АСТ, билирубин** – каждые 2-3 месяца в 1-й год терапии
- **КФК, креатинин, мочеви́на**
- При совместном применении с антикоагулянтами – **МНО**
- При совместном применении с гипогликемическими средствами – **уровень глюкозы**

Никотиновая кислота

Механизм действия – угнетение синтеза в печени ЛПОНП, а также уменьшение высвобождения из адипоцитов СЖК, из которых синтезируются ЛПОНП с вторичным уменьшением образования ЛПНП; уменьшение ТГ на 20-25%, снижение ХС на 10-25%, повышение ЛПВП на 15-30% за счет уменьшения катаболизма ЛПВП и основного АпоАI

Эффективность

- ХС
- ЛПНП
- ТГ
- ЛПВП

1 раз в 3-6 месяцев

Безопасность

- Глюкоза
- Мочевая кислота
- АЛТ, АСТ
- КФК

1 раз в 2 месяца

Омега-3 ПНЖК

- Снижение более чем на 50% образования ХМ в кишечнике
- Угнетают синтез ТГ и ЛПОНП в печени
- Активируют окисление жирных кислот в тканях

Эффективность

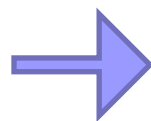
- ТГ исходно и через 1
 месяц терапии

Безопасность

- АЛТ, АСТ – при дозе 2-4 г через 1
 месяц
- При комбинации со статинами –
 по схеме лабораторного контроля
 терапии статинами
- При сочетании с антиагрегантами
 – АДФ-индуцированная
 агрегатометрия, проточная
 цитометрия – через 2 недели

Этапы и условия диагностики липидных нарушений

□ 1-й этап – скрининговое определение ХС и ТГ

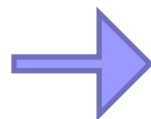


□ Point-of-care testing

□ Пациент

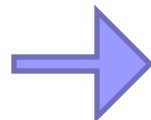
□ Врач семейной
медицины

□ 2-й этап – определение липидного спектра: ХС, ТГ, ЛПВП, ЛПНП



□ Центральная клиническо-диагностическая лаборатория

□ 3-й этап – типирование ГЛП в настоящее время проводят при уровне ХС и ТГ, превышающем 6,2 и 2,3 ммоль/л, соответственно



□ Специализированная лаборатория или научно-исследовательская лаборатория

Лабораторные технологии

- Иммунологические
 - ИФА,
иммунотурбидиметрия,
иммунохимия и др.
- Биохимические
 - Ферментативные и др.
- Физико-химические
 - ВЖХ
- Молекулярно-генетические
 - ПЦР



Портативные анализаторы (point-of-care-testing)

(+):

- Быстрое получение результатов содержания ХС и ТГ
- Простота выполнения исследования
- Небольшое количество образца

!!!

- Ориентировочный результат
- Высокая стоимость



Анализаторы для кабинетов врачей семейной медицины



- Позволяют проводить исследования в кабинете врача, в лаборатории, в кабинетах

- Другие показатели – глюкоза, АЛТ, АСТ, hsCRP
- Портативный прибор
- Простая процедура исследования
- Лабораторное качество

!!! Высокая стоимость



Приборы для контроля липидного статуса (ХС, ТГ, ЛПНП, ЛПВП)

□ Полуавтоматические биохимические

□ Автоматические биохимические



Методы определения ХС и ТГ

□ Ферментативные методы

□ Референтные методы – метод изотопного разведения и масс-спектрометрии

Методы определения ЛПНП, ЛПВП

ЛПНП

- Прямой количественный метод
- Расчетный формула Фридвальда
 - $ЛПНП = ОХС - ЛПВП - ЛПОНП$
 - или
 - $ЛПНП = ОХС - (ЛПВП + ТГ / 2,2)$

!!! не дает точных результатов
при ГЛП III типа и $ТГ > 4,5$ ммоль/л

- Прямое без осаждения определение (гомогенные методы)
(+) – возможность полной автоматизации исследования,
высокая воспроизводимость

ЛПВП

- Прямой ферментативный метод после осаждения других фракций - метод преципитац



Определение аполипопротеинов

- Иммуноферментный анализ (ELISE)
 - Липопротеин (a)
- Иммунотурбидиметрический метод определения специфических белков
 - Апо А1, АпоВ100, липопротеин (a)
- Референтный метод – радиоиммунный метод



(+)

- Техническая простота выполнения
- Доступность для многих лабораторий

!!!

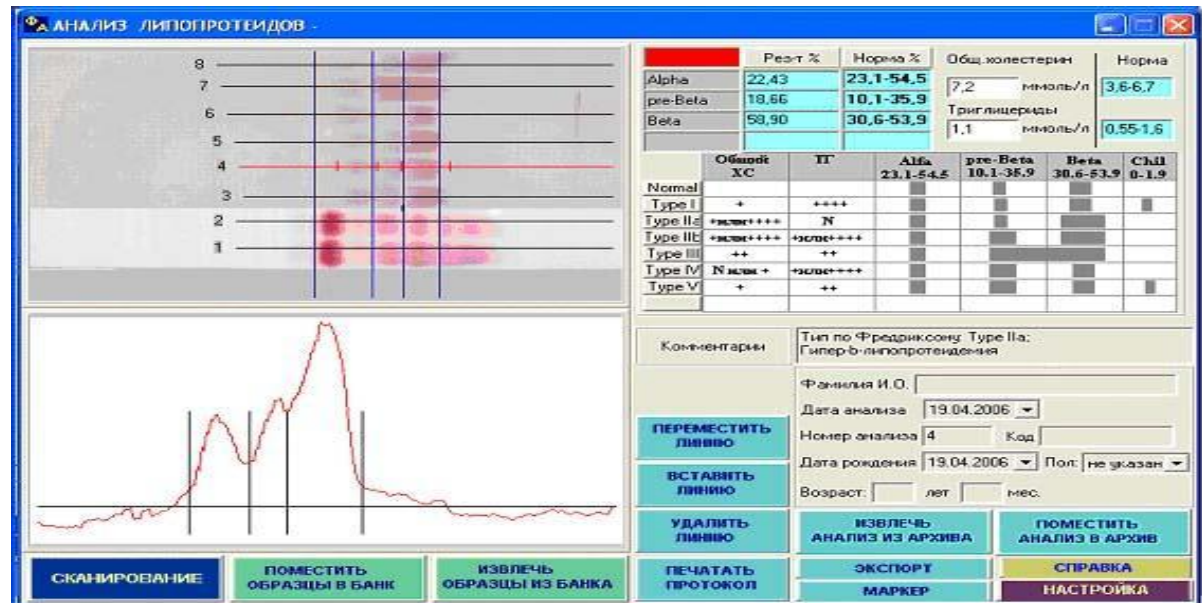
- Дороговизна реагентов
- Возможность определения только одного анализата со специфическими антителами

Лабораторные методы фенотипирования дислиппротеинемий

Электрофорез в агаровом геле

!!! сложный, трудоемкий (в научно-исследовательских лабораториях)

Капиллярный электрофорез



Лабораторные методы фенотипирования дислиппротеинемий

Высокоэффективная
жидкостная хроматография

Зональное ультрацентри-
фугирование в вертикальном
роторе

Ядерно-магнитная
резонансная спектроскопия



(+)

- Низкая систематическая ошибка
- Возможность определения сразу нескольких аналитов

!!!

- Техническая сложность выполнения для лаборатории

Благодарю за внимание!

