

Diagnostična uporabnost določanja koncentracije lipoproteina(a) in genetske variabilnosti gena *LPA*

Diagnostic utility of determination of lipoprotein(a) concentration and genetic variability of the LPA gene

Tina Levstek^{1,2}, Mojca Božič Mijovski^{3,4}, Miran Šebeštjen^{5,6,7}, Katarina Trebušak Podkrajšek^{1,2}

¹Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko

²Univerzitetni klinični center Ljubljana, Pediatrična klinika, Klinični inštitut za specialno laboratorijsko diagnostiko

³Univerzitetni klinični center Ljubljana, Klinični oddelek za žilne bolezni, Laboratorij za hemostazo in aterotrombozo

⁴Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za klinično kemijo

⁵Univerzitetni klinični center Ljubljana, Klinični oddelek za žilne bolezni

⁶Univerzitetni klinični center Ljubljana, Klinični oddelek za kardiologijo

⁷Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Katedra za interno medicino

Avtor za korespondenco:

Asist. Tina Levstek, mag. lab. biomed.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana
e-pošta: tina.levstek@mf.uni-lj.si

Tina Levstek je štipendistka Univerzitetne ustanove ing. Lenarčič Milana.

POVZETEK

Koncentracija lipoproteina(a) (Lp(a)) je določena genetsko in je neodvisni dejavnik tveganja za srčno-žilne bolezni. Lp(a) je s holesterolom bogat lipoproteinski delec, ki nastaja v jetrih. Sestavljen je iz apolipoproteina B100 in apolipoproteina(a) (apo(a)), ki sta povezana z disulfidno vezjo. Apo(a) kodira *LPA*, ki je eden najbolj polimorfnih genov pri človeku, saj je bilo identificiranih že več kot 40 genetskih variant. Koncentracija Lp(a) je v 90 % genetsko določena preko variant v genu *LPA* in je v aterogenem območju (> 300 mg/L) prisotna pri 20 do 30 % populacije. V zadnjem desetletju je prišlo do velikega napredka pri razumevanju mehanizmov, ki so vpleteni v sintezo in presnovo Lp(a), kar je izboljšalo tudi ra-

zumevanje patofiziologije Lp(a) in dejavnikov, ki vplivajo na njegovo koncentracijo. Kljub temu da določanje Lp(a) še ni standardizirano, s kliničnega vidika zadostuje za prepoznavanje posameznikov s povečanim tveganjem za srčno-žilne bolezni. Pri teh posameznikih je ključno zmanjšanje tveganja, zato so v postopku razvoja nove, obetavne terapijske možnosti za zniževanje koncentracije Lp(a), ki so usmerjene proti mRNA gena *LPA*. Namen prispevka je predstavitev najnovejših ugotovitev o strukturi, sintezi, presnovi, patofizioloških mehanizmih in terapijskih možnostih za zniževanje koncentracije Lp(a) ter izpostaviti izzive pri njegovem določanju v kliničnih laboratorijih.

Ključne besede: lipoprotein(a), dislipidemija, srčno-žilna bolezen, ateroskleroza

»

ABSTRACT

Lipoprotein(a) (Lp(a)) is an inherited and independent risk factor for cardiovascular diseases. Lp(a) is a cholesterol-rich lipoprotein synthesized in the liver. It consists of apolipoprotein B100 and apolipoprotein(a) (apo(a)) linked by a disulfide bond. Apo(a) is encoded by *LPA* gene, one of the most polymorphic genes in humans, as more than 40 gene variants have been discovered. Lp(a) levels are 90% genetically determined by variants in the *LPA* gene and are in the atherogenic range (> 300 mg/L) in 20 to 30% of the population. In the last decade, immense progress has been made in understanding the mechanisms involved in the synthesis and metabolism of Lp(a). This has also improved the understanding of the pathophysiology of Lp(a) and the factors affecting Lp(a) concentration. Although the determination of Lp(a) is not yet standardized, from a clinical point of view it allows the identification of individuals at increased risk for cardiovascular diseases. To reduce risk, promising new therapeutic options are currently being developed to directly lower Lp(a) concentrations by targeting *LPA* mRNA. The aim of this article is to present the latest knowledge on the structure, synthesis, metabolism, pathophysiological mechanisms, and therapeutic options for lowering Lp(a) and to address challenges in determining Lp(a) concentration in clinical laboratories.

Key words: lipoprotein(a), dyslipidemia, cardiovascular disease, atherosclerosis

UVOD

Srčno-žilne bolezni še vedno predstavljajo glavni vzrok smrti v razvitih državah in to kljub temu da je v zadnjem desetletju prišlo do velikega napredka pri postavitvi diagnoze, zdravljenju in ozaveščanju o preventivnih ukrepih (1). Ateroskleroza je kronična, progresivna vnetna bolezen, ki se začne v mladosti ali v drugem desetletju življenja, klinično pa se izrazi v zrelih oz. poznih letih (2). Glavne dejavnike tveganja delimo na modificirajoče (hiperholesterolemija, sladkorna bolezen, hipertenzija) in nemodificirajoče (starost, spol, genetska predispozicija). Pomembno vlogo pri razvoju ima tudi življenjski slog (kajenje, debelost, telesna nedejavnost). Ker je ateroskleroza počasi napredujoča bolezen, je prepoznavanje oseb s povečanim tveganjem za srčno-žilne dogodke zelo pomembno, saj omogoča pra-

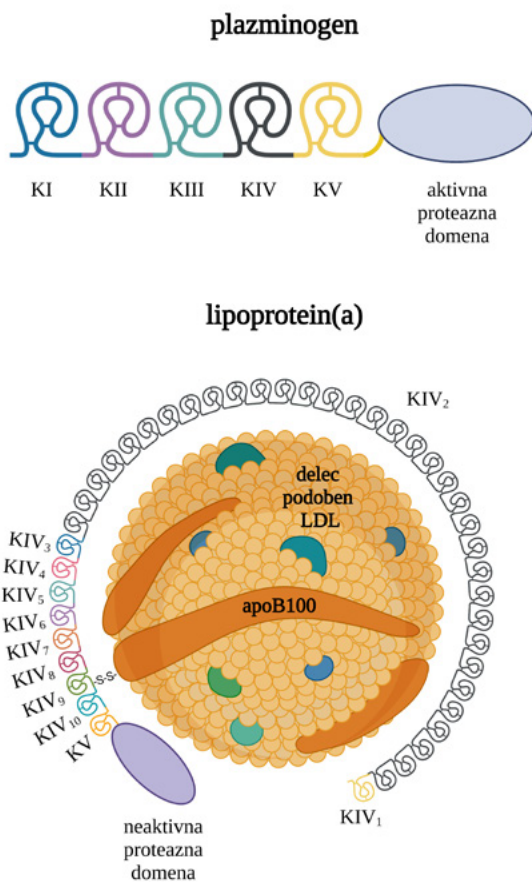
vočasno uvedbo preventivnih ukrepov in s tem nižjo stopnjo obolevnosti in umrljivosti (2).

Lipoprotein(a) (Lp(a), lipoprotein mali(a)) je leta 1963 prvič opisal norveški zdravnik Kåre Berg, ko je izvajal poskus hiperimunizacije zajcev z lipoproteini nizke gostote (LDL), izoliranimi iz krvi 20 zdravih posameznikov. Pri tem je odkril protitelo, ki je prepoznalo »antigen Lp«, imenovan Lpa. Ta antigen je bil prisoten pri 34 % od 314 testiranih serumov zdravih odraslih oseb, ki so jih poimenovali Lpa⁺ (3). Nadaljnje raziskave so pokazale, da je zvišana koncentracija Lp(a) neodvisni dejavnik tveganja za srčno-žilne dogodke ne glede na koncentracijo holesterola LDL (4). Določanje koncentracije Lp(a) zaenkrat ne poteka rutinsko. Ker ima povišano koncentracijo Lp(a) kar 20 do 30 % populacije, pomanjkljivo prepoznavanje oseb z zvišanimi koncentracijami Lp(a) prispeva k obolevnosti in umrljivosti zaradi srčno-žilnih bolezni (5). Zato bi koncentracijo Lp(a) v serumu ali plazmi morali določati pri vseh posameznikih s hiperholesterolemijo ter pri bolnikih z znano srčno-žilno boleznijo ali družinsko obremenjenostjo z namenom dodatne opredelitve tveganja. Zmanjšanje tveganja za srčno-žilne dogodke je izrednega pomena, zato so v razvoju nove, obetavne terapevtske možnosti za zniževanje koncentracije Lp(a), ki so usmerjene proti mRNA gena *LPA*. Pričakujemo, da bo določanje koncentracije Lp(a) v laboratorijski diagnostiki v prihodnosti bolj pogosto, še posebej pa smiselno pri osebah s povečanim tveganjem za srčno-žilne bolezni. Namen prispevka je predstavitev najnovejših ugotovitev o strukturi, sintezi, presnovi, patofizioloških mehanizmi in terapevtskih možnostih za zniževanje koncentracije Lp(a) ter izpostaviti nekatere izzive pri njegovem določanju v kliničnih laboratorijih.

ZGRADBA LIPOPROTEINA(a)

Lp(a) je lipoprotein, ki vsebuje holesterol, sestavljen iz apolipoproteina B100 (apoB100). ApoB100 je preko disulfidne vezi vezan na apolipoprotein(a) (apo(a)), patognomonično komponento Lp(a). ApoB100 je delec, podoben holesterolu LDL, apo(a) pa je glikoprotein, ki ga kodira gen *LPA*. Gen *LPA* se nahaja na dolgi ročici kromosoma 6 (6q26-27) in spada med najbolj polimorfne gene pri človeku, saj je bilo odkritih že več kot 40 njegovih variant (5). Gen *LPA* je nastal s podvojitvijo gena za plazminogen (*PLG*), zato je struktura apo(a) homologna strukturi plazminogena. Plaz-

minogen vsebuje pet različnih zavrtih odsekov, t. i. domen v obliki lasnice (angl. *kringle*) (KI do KV), in aktivno proteazno domeno, medtem ko apo(a) ne vsebuje kringl domen KI, KII in KIII, prisotne pa so KV, inaktivna proteazna domena ter deset različnih podtipov KIV (KIV₁₋₁₀), in sicer po ena ponovitev KIV₁ in KIV₃₋₁₀, število ponovitev KIV₂ pa variira od ene do več kot 40 (Slika 1). Molekulska masa Lp(a) je zato zelo različna in se giblje med 250 in 800 kDa (6).



Slika 1: Primerjava zgradbe plazminogena in lipoproteina(a) (Lp(a)). Plazminogen sestavlja pet domen v obliki lasnice (KI–KV) in aktivna proteazna domena. Lp(a) pa sestavlja deset različnih podtipov KIV (KIV₁–KIV₁₀), KV in neaktivna proteazna domena. Število KIV₂ variira od ene do več kot 40 ponovitev. Slika je bila pripravljena s spletnim orodjem BioRender.com.

Figure 1: Comparison of plasminogen and lipoprotein(a) (Lp(a)) structure. Plasminogen consists of five kringle domains (KI–KV) and active protease domain. Lp(a) consists of ten different types of KIV (KIV₁–KIV₁₀), KV, and non-active protease domain. The number of KIV₂ varies from one to more than 40. Created with BioRender.com.

SINTEZA IN RAZGRADNJA LIPOPROTEINA(a)

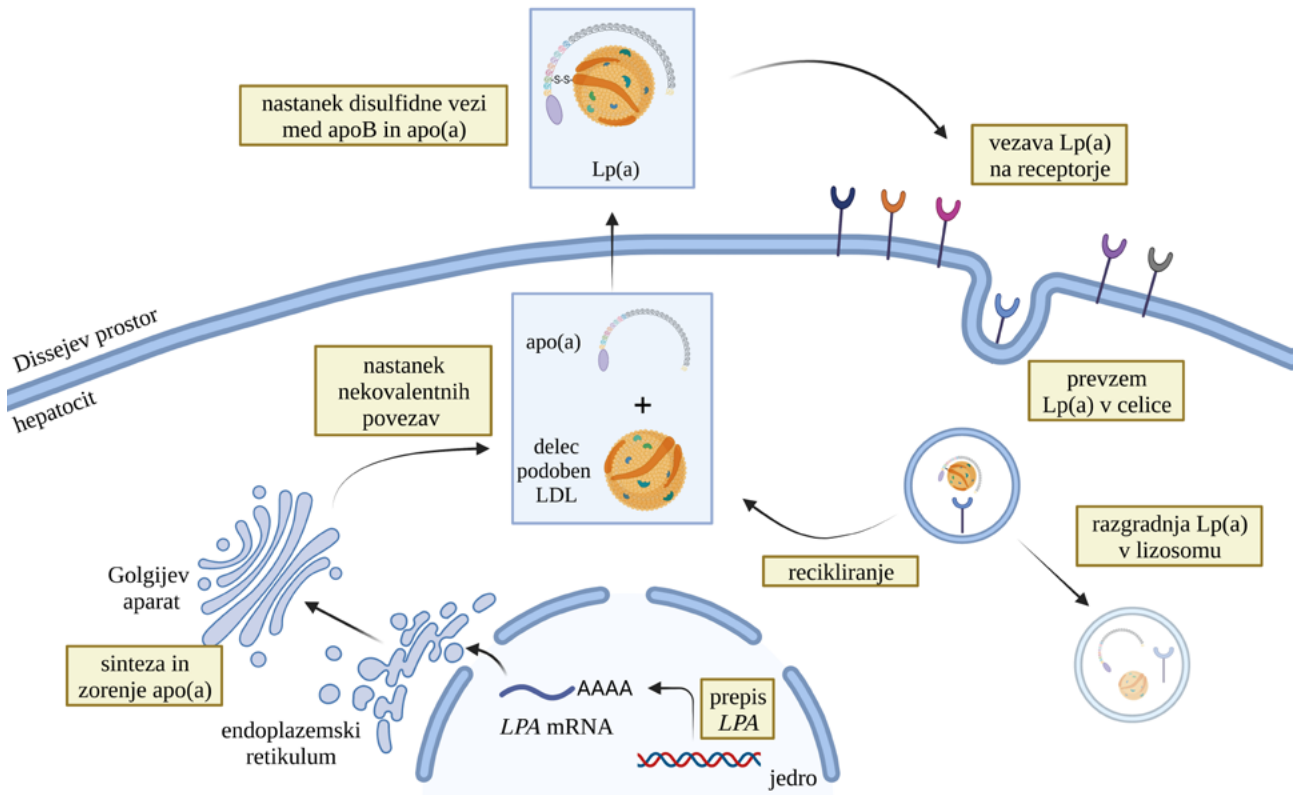
Tako apoB100 kot tudi apo(a) se sintetizirata izključno v hepatocitih (7). Sintezi apo(a) sledijo posttranslacijske modifikacije v endoplazemskem retikulumu (ER), vključno z nastankom treh disulfidnih vezi znotraj vsake kringl domene in *N*-glikozilacijo, ki omogoči povezave s kalneksinom in kalretikulinom. Le-te so potrebne za pravilno strukturno konformacijo apo(a) ter njegovo izločanje iz ER (8). Koliko časa apo(a) ostane v ER, je odvisno od števila ponovitev KIV₂. Čas je sorazmeren številu ponovitev, zato so večje izooblike bolj podvržene razgradnji v proteasomih. To morda lahko delno pojasni dejstvo, da je koncentracija Lp(a) praviloma višja pri posameznikih, ki nosijo zapis za krajše izooblike apo(a) (9, 10). Iz ER se apo(a) premakne v Golgijev aparat, kjer potече še nadaljnja *N*- in *O*-glikozilacija. Pri *O*-glikozilaciji se oligosaharid veže na apo(a) preko hidroksilne skupine serina oz. treonina, pri *N*-glikozilaciji pa preko aminske skupine asparagina.

Nastanek Lp(a) je dvostopenjski proces, v katerem se apo(a) poveže z apoB100. V prvem koraku znotraj hepatocitov nastanejo nekovalentne povezave med lizinskimi ostanki na apoB100 in kringl domenami KIV₇ in KIV₈ apo(a) (11). Nato v zunajceličnem prostoru sledi encimsko kataliziran nastanek disulfidne vezi med cisteinom na aminokislinskem mestu 4326 na C koncu delca in cisteinom na mestu 4057 na KIV₉ (12). Encim, ki katalizira to reakcijo, še ni znan, prav tako tudi ni pojasnjeno, ali reakcija potече neposredno na celični membrani ali v Dissejevem prostoru.

Prav tako tudi mehanizem katabolizma in odstranjevanja Lp(a) iz plazme še ni popolnoma razjasnjen. Znano je, da ta korak ni najpomembnejši pri uravnavanju koncentracije Lp(a) v krvnem obtoku. Glavno mesto odstranjevanja Lp(a) so jetra, v precej manjši meri pa sodelujejo pri odstranjevanju tudi ledvice in arterijska žilna stena (13). Tudi receptorji, ki sodelujejo pri privzemu Lp(a) v hepatocite, še niso popolnoma znani. Na vezavo na receptor in privzem Lp(a) najverjetneje vplivajo koncentracija Lp(a), velikost molekule apo(a), proteini, vezani na Lp(a), in vsebnost lipidov v Lp(a). Pri vezavi Lp(a) sodelujejo številni receptorji, med drugim receptor LDL (LDLR), plazminogeni receptorji, TLR2 (okr. angl. *toll like receptor 2*), SRB1 (okr. angl. *scavenger receptor class B type 1*), ASGPR (okr. angl. *asialoglycoprotein receptor*), LRP1, LRP2 in LRP8 (okr. angl. »

low-density lipoprotein receptor-related protein-1, -2 in -8), vendar njihov prispevek pri katabolizmu Lp(a) ostaja zanemarljivo neznan. Predvidoma se Lp(a) po endocitozi razgra-

di v lizosomih (14, 15, 16). Shematski potek sinteze in presnove Lp(a) je prikazan na Sliki 2.



Slika 2: Sinteza in presnova lipoproteina(a) (Lp(a)). ApolipoproteinB100 (apoB100) in apolipoprotein(a) (apo(a)) se sintetizirata v jetrih. Nastanek Lp(a) poteka v dveh korakih. Najprej znotrajcelično nastanejo nekovalentne povezave med apo(a) in apoB100 na delcu, podobnemu holesterolu LDL, čemur zunaj celice sledi nastanek disulfidne vezi. Lp(a) se iz krvnega obtoka odstranjuje v največji meri preko privzema v jetra, pri čemer sodelujejo različni receptorji. Po endocitozi se Lp(a) razgradi v lizosomu ali pa se reciklira. Slika je bila pripravljena s spletnim orodjem BioRender.com.

Figure 2: Synthesis and metabolism of lipoprotein(a) (Lp(a)). ApolipoproteinB100 (apoB100) and apolipoprotein(a) (apo(a)) are synthesized in the liver. The formation of Lp(a) occurs in two steps. First, non-covalent bonds between apo(a) and apoB100 are formed intracellularly on the LDL-like particle, followed by extracellular formation of a disulfide bond. Lp(a) is largely removed from the circulation by uptake into the liver, involving various receptors. After endocytosis, Lp(a) is degraded in the lysosome or recycled to serve as precursors for new Lp(a) particles. Created with BioRender.com. >>

FIZIOLOŠKA VLOGA LIPOPROTEINA(a)

Fiziološka vloga Lp(a) še ni popolnoma razjasnjena. Lp(a) naj bi spodbujal celjenje ran in popraviljanje tkiv, saj se akumulira v poškodovanem endoteliju, veže na številne komponente žilne stene in subendotelijskega matriksa, stimulira aktivacijo kemotakse monocitov in makrofagov ter uravnava angiogenezo (17, 18). Skrajno nizka koncentracija Lp(a) sicer ni povezana z nobeno boleznijo ali simptomi (3, 17).

PATOFIZIOLOŠKI MEHANIZMI LIPOPROTEINA(a)

Zvišana koncentracija Lp(a) je povezana z večjim tveganjem za aterosklerotične srčno-žilne bolezni (19). Lp(a) prispeva k tveganju za srčno-žilne bolezni preko številnih mehanizmov, ki jih delimo na proaterogene, provnetne in protrombotične. Lp(a) ima vse aterogene lastnosti delcev LDL, poleg tega molekula apo(a) aterogeno delovanje še poveča. Podobno kot holesterol LDL se tudi Lp(a) kopiči v steni arterij, kjer se lahko oksidira, kar vodi v nastanek penastih celic (20). Na lipidni ovojnici Lp(a) je prisoten tudi monocitni kemoatraktantni protein-1 (MCP-1), ki olajša njegov vstop v arterijsko steno (21). Poleg tega Lp(a) zveča izražanje adhezijskih molekul in stimulira migracijo ter razrast žilnih gladkih mišičnih celic (22, 23). Provnetno delovanje Lp(a) je povezano predvsem s prisotnostjo oksidiranih fosfolipidov, še posebej oksidiranega fosfatidilholina na domeni KIV₁₀ apo(a) (24). Lp(a) lahko sproži izločanje vnetnih citokinov in migracijo monocitov preko endotelija, kar prispeva k nastanku in napredovanju ateroskleroze. Oksidirani fosfolipidi na Lp(a) pa prispevajo tudi k disfunkciji endotelijskih celic (25). Ker je struktura Lp(a) podobna plazminogenu, lahko Lp(a) tudi zavira fibrinolizo, saj tekmuje za vezavna mesta na plazminu in tako poruši ravnovesje med koagulacijo in fibrinolizo. Po drugi strani pa Lp(a) poveča izražanje tkivnega faktorja predvsem v aterosklerotičnih lezah in tako poveča možnost arterijske tromboze in s tem akutnega srčno-žilnega dogodka (26).

Poleg zvečanega tveganja za aterosklerotične srčno-žilne bolezni je zvišana koncentracija Lp(a) povezana tudi s tveganjem za nastanek in napredovanje stenoze aortne zaklopke (27, 28). Ko je poškodovan endotelij v aortni zaklopki, pride do vdora Lp(a), holesterola LDL in vnetnih celic, kot so makrofagi in limfociti T (29). Oksidirani fosfolipidi na apo(a) stimulirajo intersticijske celice zaklopke, da inducirajo osteoplastno diferenciacijo ali apoptozo (30). Oksidirani fosfolipidi so substrat za z lipoproteini povezano fosfolipazo A2 (Lp-PLA2), ki iz njih sintetizira lizofosfatidilholin. Lp-PLA2 se izraža prav v intersticijskih celicah zaklopk. Avtotaksin, ki se prav tako transportira v aortno zaklopko, vezan na Lp(a), lahko pretvori lizofosfatidilholin v lizofosfatidno kislino in tako neposredno sodeluje pri kalcifikaciji zaklopke (31).

DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA KONCENTRACIJO LIPOPROTEINA(a)

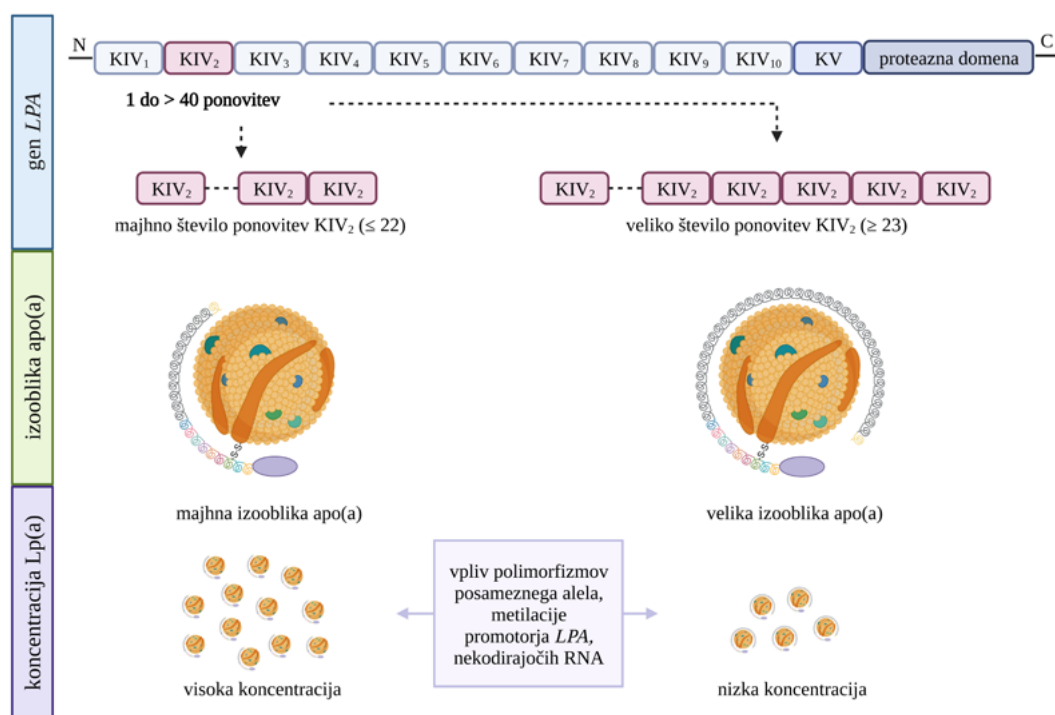
Variabilnost gena *LPA*

Koncentracija Lp(a) je v 90 % genetsko določena preko variant gena *LPA* in se deduje avtosomno kodominantno. Več kot 95 % posameznikov nosi zapis za dve varianti gena *LPA*, vsako podedovano od enega starša (32). Zaradi genetske variabilnosti je razlika v koncentraciji Lp(a) med posamezniki lahko tudi več kot 1000-kratna (5). Velikost izooblike apo(a), ki je premo sorazmerna številu ponovitev KIV₂, pojasni okoli 40–70 % variabilnosti v koncentraciji Lp(a) (5, 10). Izooblike z nizko molekulsko maso (10–22 KIV₂) so povezane s približno štiri- do petkrat višjo mediano koncentracije Lp(a) v primerjavi z izooblikami z visoko molekulsko maso (> 22 KIV₂). Povezava med zgradbo *LPA*, izoobliko apo(a) in koncentracijo Lp(a) je prikazana na Sliki 3. Na koncentracijo poleg števila ponovitev KIV₂ vplivajo tudi drugi dejavniki, kot so polimorfizmi posameznega alela (okr. angl. *single nucleotid polymorphism*, SNP) in metilacija promotorja *LPA* (33). Povezava med izoobliko apo(a) in SNP-ji v *LPA* je izjemno heterogena, saj lahko prisotna izooblika zakrije vpliv SNP-ja in obratno. Večina SNP-jev zniža koncentracijo Lp(a), medtem ko so SNP-ji, ki zvišajo koncentracijo Lp(a), zelo redki. »

V raziskavi na slovenskih bolnikih s stabilno koronarno arterijsko boleznijo in povišanimi vrednostmi Lp(a) je bilo na primer ugotovljeno, da sta polimorfizma posameznega alela rs10455872 in rs3798220, ki se nahajata v *LPA*, in prisotni haplotipi povezani s koncentracijo Lp(a) (34). Frekvenca SNP-jev je zelo različna in se giblje med manj kot 0,1 in več kot 20 %. Zanimivo je, da se nekateri SNP-ji pojavljajo samo pri določenih izooblikah apo(a). Poleg tega pogostost SNP-jev variira tudi med različnimi rasami. Zadnje ugotovitve kažejo, da so funkcionalni SNP-ji prisotni tudi znotraj ponovitev KIV₂ (33). Zaradi velike homolognosti med ponovitvami KIV₂ in dejstva, da SNP-ji niso prisotni v vseh ponovitvah, sekvenciranje po Sangerju in genotipizacijske metode ne omogočajo določanja genetske variabilnosti v ponovitvah KIV₂. Z razvojem nove generacije sekvenciranja pa se je občutljivost sekvenciranja zelo povečala in tako lahko določimo SNP, ki je prisot-

ten le v eni izmed več kot 40 ponovitev KIV₂ (35). Razumevanje vpliva genetske variabilnosti je pomembno za razvoj novih terapevtskih pristopov, predvsem genetske terapije, in je cilj številnih raziskav. V diagnostične namene pa se trenutno še ne uporablja.

Omeniti velja še vpliv nekodirajočih RNA, med katere sodijo tudi mikroRNA (miRNA). To so kratke, 18–26 nukleotidov dolge, enoverižne RNA molekule, ki vplivajo na izražanje genov na posttranskripcijski ravni, in sicer preko razgradnje tarčne informacijske RNA (mRNA) ali zaviranja prevajanja mRNA (36). Znano je, da miRNA vplivajo na sintezo in presnovo lipidov ter so vpletene v nastanek in napredovanje srčno-žilnih bolezni (37, 38). Vpliv miRNA na koncentracijo Lp(a) je do sedaj malo raziskan, znano pa je, da v *in vitro* pogojih miR-23b-3p in miR-125b-5p zavirata sintezo apo(a) in tako znižujeta koncentracijo Lp(a) (39).



Slika 3: Povezava med zgradbo gena *LPA*, izoobliko apolipoproteina(a) (apo(a)) in koncentracijo lipoproteina(a) (Lp(a)).

Variabilno število ponovitev KIV₂ v genu *LPA* vpliva na velikost izooblike apo(a) in s tem na koncentracijo Lp(a) v krvnem obtoku. Slika je bila pripravljena s spletnim orodjem BioRender.com.

Figure 3: Association between *LPA* gene structure, apolipoprotein(a) (apo(a)) isoform and lipoprotein(a) concentration (Lp(a)).

The variable number of KIV₂ repeats in the *LPA* gene affects the size of the apo(a) isoform and thus the concentration of Lp(a) in the circulation. Created with BioRender.com.

»

Vpliv drugih dejavnikov na koncentracijo lipoproteina(a)

Koncentracija večine lipoproteinov je odvisna od življenjskega sloga in fizioloških dejavnikov, ki se skozi življenje močno spreminjajo. Koncentracija Lp(a) pa je pretežno genetsko določena, zato imajo negenetski dejavniki manjši vpliv. Kljub temu so znani nekateri dejavniki, ki vplivajo na koncentracijo Lp(a) v krvnem obtoku, vendar se je treba zavedati, da je vpliv dejavnika pri posamezniku odvisen tudi od prisotne izooblike Lp(a) in začetne koncentracije Lp(a). Teščost ne vpliva na koncentracijo Lp(a) (40).

Koncentracija Lp(a) je takoj po rojstvu nizka in se v času prvega leta podvoji. Izražanje gena *LPA* se dokončno vzpostavi do prvega oz. drugega leta starosti (41, 42). Tako pri otrocih kot tudi pri odraslih so raziskave, ki bi longitudinalno preučevale spreminjanje koncentracije Lp(a), precej redke, njihovi rezultati pa so si nasprotujoči. Splošno veljavna predpostavka je, da se koncentracija Lp(a) s starostjo ne spreminja. Nasprotno je nedavno objavljena nizozemska longitudinalna raziskava na veliki kohorti otrok pokazala, da se je koncentracija Lp(a) od osmega do 20. leta povprečno zvišala za 22 % pri tistih otrocih, ki niso jemali zdravil za zniževanje koncentracije lipidov, medtem ko se je koncentracija Lp(a) pri tistih otrocih, ki so jemali statine, zvišala za 43 %. Poleg tega je bila intravariabilnost kar 70 % (43). Pri odraslih nekatere raziskave kažejo, da se s staranjem koncentracija Lp(a) zvišuje, druge pa to povezavo zavračajo (44, 45).

Tudi vpliv spola na koncentracijo Lp(a) še ni popolnoma razjasnjen. Nekatere raziskave kažejo, da imajo ženske višjo koncentracijo Lp(a) v primerjavi z moškimi, vendar so potrebne nadaljnje raziskave za osvetlitev razlik v koncentraciji in njihov prispevek k tveganju za srčno-žilne bolezni (46). Odprto ostaja tudi vprašanje o vplivu menopavze na koncentracijo Lp(a). Nekatere raziskave namreč kažejo, da je koncentracija Lp(a) pri ženskah v postmenopavzi višja, vendar zaenkrat še ni mogoče izključiti vpliva staranja na zvišano koncentracijo v tem obdobju (47). Hormonsko nadomestno zdravljenje znižuje Lp(a) za približno 20 % (48). Oblika hormonskega nadomestnega zdravljenja vpliva tudi na spremembo koncentracije Lp(a). Izkazalo se je, da oralno nadomestno hormonsko zdravljenje v nasprotju s transdermalnim statistično pomembno zniža koncentracijo Lp(a) (49). Na koncentracijo Lp(a) vpliva tudi nosečnost. Koncentracija se tekom prvega trimestra

zviša in doseže najvišjo vrednost na sredini drugega trimestra, ko so vrednosti približno trikrat višje kot pri osmih tednih nosečnosti. Po porodu se koncentracija Lp(a) vrne na osnovno raven (50).

Razlike v koncentraciji in porazdelitvi koncentracije Lp(a) v populaciji sta bili opaženi tudi med različnimi rasami. Črnci imajo najvišjo koncentracijo Lp(a), sledijo jim južni Azijci, Kavkazijci, Hispanci in zahodni Azijci. Kljub temu je bila pri vseh rasah povišana koncentracija povezana s tveganjem za srčno-žilne bolezni, mejne vrednosti za povišano tveganje za posamezno rasno oz. etično skupino pa še vedno niso opredeljene. Pri črncih koncentracija Lp(a) v populaciji sledi normalni porazdelitvi, pri Kavkazijcih pa porazdelitvi s pozitivno asimetrijo. Razlike v koncentraciji in razporeditvi Lp(a) med rasami deloma razložijo razlike v velikosti gena *LPA* ter različni prisotnosti polimorfizmov posameznega alela znotraj ali v bližini gena *LPA* (51).

Vpliv diete na koncentracijo Lp(a) je še vedno predmet raziskav. Rezultati randomiziranih kliničnih raziskav kažejo, da zmanjšanje vnosa nasičenih maščob in njihova nadomestitev s proteini, ogljikovimi hidrati in nenasičenimi maščobami zviša raven Lp(a) za 10–15 %, medtem ko se koncentracija holesterola LDL zniža (46). Fizična aktivnost za razliko od ostalih lipidov in lipoproteinov nima oz. ima samo majhen vpliv na koncentracijo Lp(a). Nekatere raziskave so sicer pokazale srednji vpliv visoko intenzivne vadbe, aerobne vadbe in nizko intenzivne vzdržljivostne vadbe pri mlajših preiskovancih, vendar pri teh ni bil upoštevan vpliv izooblike apo(a), prav tako v nekaterih raziskavah ni bila vključena kontrolna skupina (46).

Na koncentracijo Lp(a) vplivajo tudi patofiziološka stanja, kot so ledvična in jetrna okvara ter vnetje. Zvišana koncentracija Lp(a) je bila namreč ugotovljena pri bolnikih s kronično ledvično boleznijo, proteinurijo in nefrotskim sindromom, najverjetneje zaradi vloge ledvic v katabolizmu in odstranitvi Lp(a) (52). Tudi bolniki na nadomestnem dializnem zdravljenju imajo višjo raven Lp(a), medtem ko imajo bolniki po presaditvi ledvic nižjo v primerjavi s kontrolnimi preiskovanci (53). Se pa je izkazalo, da se koncentracija Lp(a) po presaditvi ledvic pomembno zniža skupaj z ostalimi dejavniki tveganja, ki so odvisni od ledvične insuficience (54). Apo(a) se sintetizira v jetrih, zato jetrna funkcija vpliva na koncentracijo Lp(a). S presnovno motnjo povezana maščobna jetrna bolezen je povezana z nižjo koncentracijo Lp(a) v primerjavi s kontrolnimi preiskovanci, prav tako je koncentracija Lp(a) nižja tudi pri »

bolnikih s kroničnimi jetrnimi boleznimi, kot so ciroza, hepatitis C in hepatocelularni karcinom (55, 56). Na koncentracijo Lp(a) vpliva tudi sistemsko vnetje, ki je prisotno pri vseh fazah aterosklerotičnega procesa. Kronično sistemsko vnetje povzroči dvig koncentracije Lp(a), ki korelira s koncentracijo C-reaktivnega proteina (CRP) in interleukina 6 (IL6). V genu *LPA* se namreč nahajajo odzivni elementi na IL6 (angl. *IL6 response elements*), poleg tega pa Lp(a) tudi pospeši sproščanje proinflammatoryh citokinov iz žilnih endotelnih ter gladkih mišičnih celic, kot tudi iz monocitov in makrofagov (57, 58).

DOLOČANJE KONCENTRACIJE LIPOPROTEINA(a)

Določanje koncentracije Lp(a) v serumu še vedno ostaja izziv zaradi velike heterogenosti v strukturi Lp(a), saj je njegova molekulska masa odvisna od izooblike apo(a). Po drugi strani pa so eksoni, ki kodirajo domene v obliki lasnice, izredno homologni. Med različnimi domenami KIV je več kot 70-odstotna homolognost, med KIV₂ pa 98- do 100-odstotna (35, 59). Pri nekaterih izooblikah apo(a) kar 70 % celotnega proteina predstavljajo zelo homologne ponovitve KIV₂ (60).

V kliničnih laboratorijih se za določanje Lp(a) pretežno uporabljajo imunske metode s protitelesi, specifičnimi za apo(a). Večina metod je občutljivih na velikost apo(a), saj ponavljajoče strukture in visoka homolognost vplivajo na meritve (Slika 4). Protitelesa, ki so usmerjena proti ponavljajočim zaporedjem, se lahko namreč na posamezen protein vežejo na več kot enem mestu. Tudi pri uporabi protiteles, ki so usmerjena proti unikatni domeni KV, lahko zaradi homolognih struktur med KV in ponovitvami KIV pride do vezave več kot enega protitelesa na posamezno molekulo apo(a). Pridobivanje protiteles, ki prepoznajo unikatni motiv na apo(a), je zelo zahtevno, zato je takih protiteles na voljo zelo malo in so običajno monoklonska. Večina protiteles proti apo(a) se pridobiva v živalskih modelih in so poliklonska, kar pomeni, da različni subkloni prepoznajo različne epitope na apo(a). Zaradi tega je zelo velika verjetnost, da so protitelesa usmerjena proti ponavljajočim strukturam molekule apo(a) (60). V takem primeru so serumske koncentracije majhnih izooblik, ki so običajno povezane z višjo koncentracijo Lp(a),

podcenjene, koncentracije velikih izooblik, ki so običajno povezane z nižjimi koncentracijami Lp(a), pa precenjene (61).

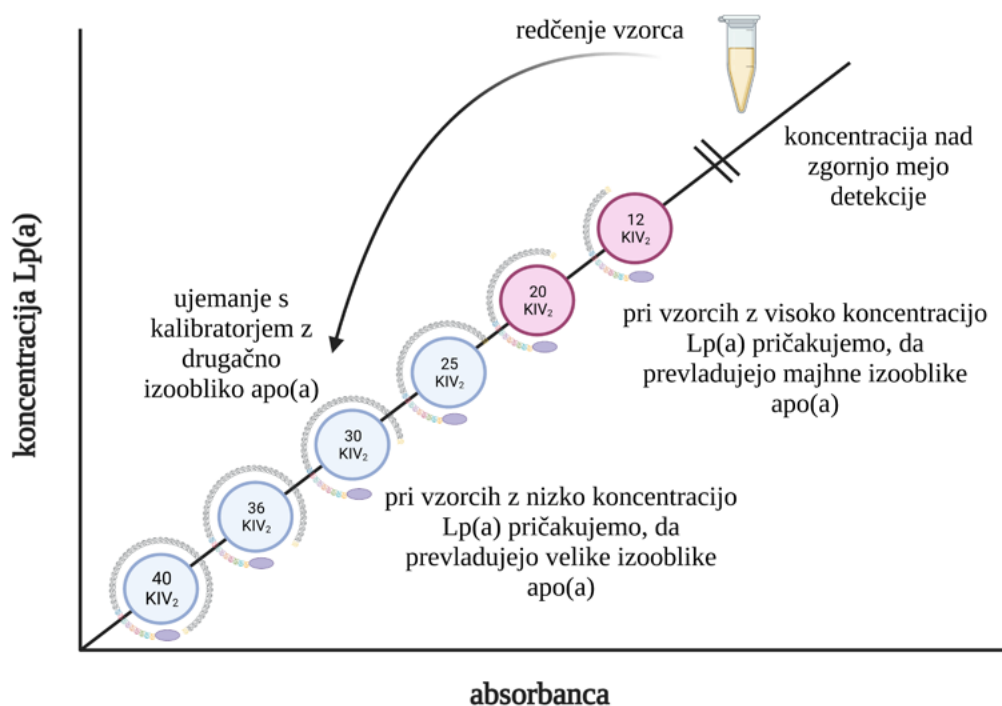
Naslednji izziv predstavljajo tudi kalibratorji, saj naj bi se z vzorcem ujemali ne samo po koncentraciji, ampak tudi po izoobliki. Pri vzorcih z visoko koncentracijo Lp(a) namreč pričakujemo majhno število ponovitev KIV₂, zato bi se morali ujemati s kalibratorjem z majhnim številom ponovitev KIV₂. Pri vzorcih z nizko koncentracijo Lp(a) pa pričakujemo veliko število ponovitev KIV₂ in bi se morali ujemati s kalibratorji z velikim številom ponovitev KIV₂ (Slika 4). Nekateri kalibratorji tako že vsebujejo različne izooblike apo(a), saj se je pri večini vzorcev na ta način možno izogniti občutljivosti zaradi različnih izooblik apo(a) (60). Zavedati pa se je treba, da je variabilnost koncentracije Lp(a) znotraj vsake skupine izooblike apo(a) tudi do 200-kratna (33). Pri analizi 5953 vzorcev so ugotovili, da je imelo 30 % vzorcev z majhnimi izooblikami apo(a) koncentracijo pod 300 mg/L, čeprav bi glede na velikost pričakovali višje koncentracije. Nasprotno pa je 11 % vzorcev z velikimi izooblikami apo(a) imelo koncentracijo višjo kot 300 mg/L in se je zato ujemalo z napačnim kalibratorjem. Podobna težava obstaja tudi pri vzorcih, ki so nad zgornjo mejo zaznane, saj bi se po redčenju tak vzorec ujemal s kalibratorjem z večjo izoobliko apo(a) (Slika 4). Takšnih vzorcev zato običajno ne redčimo, ampak podajamo rezultat kot nad zgornjo mejo zaznane. Pri izbiri kalibratorja je zato pomemben podatek o velikosti izooblik apo(a), ki so prisotne, pri veččkovnih kalibratorjih pa tudi, ali so pridobljeni z redčenjem enega samega kalibratorja ali pa so sestavljeni iz različnih kalibratorjev z različnimi izooblikami apo(a) (60).

Referenčna metoda za določanje koncentracije Lp(a) je še v razvoju. Kot referenčna metoda za standardizacijo določanja Lp(a) je bila predlagana tekočinska kromatografija, sklopljena s tandemsko masno spektrometrijo (LC-MS/MS) (62). Določanje v molskih enotah omogoča tudi uporaba specifičnega protitelesa, ki je usmerjeno proti unikatnemu epitopu na KIV₉. Vsak delec Lp(a) je tako prepoznan samo enkrat (61). Možna je tudi uporaba protiteles, ki so usmerjena proti apoB, saj vsak Lp(a) delec vsebuje le eno apoB molekulo, se pa ta princip uporablja bolj redko (61). Eden od razlogov bi lahko bil, da ta pristop zanemari prosti apo(a), ki ni vezan na holesterol LDL, in predstavlja približno 5 % celotne koncentracije apo(a). Ni sicer še znano, ali tako majhne koncentracije apo(a), pri čemer je apo(a) tudi delno fragmentiran, sploh prispevajo k aterogenosti apo(a) (63).



Zaradi omejitev in specifičnosti posameznih metod ter heterogenosti apo(a) ni mogoče neposredno pretvoriti vrednosti, izmerjenih v masnih enotah (mg/L), v molske enote (nmol/L). Kljub vsemu pa je priporočljivo določanje Lp(a) v molskih enotah. Žal so metode za sedaj slabo standardizirane, kar lahko prispeva k variaciji rezultatov, pridobljenih z različnimi metodami. Zato se je treba zavedati ome-

jitev posamezne metode, saj pri uporabi protiteles, ki so občutljiva na izoobliko apo(a), meritev v molarnih koncentracijah ni primerna, ker se lahko na posamezno molekulo apo(a) veže več protiteles. Prav tako tudi pretvorba iz masnih v molarne enote s splošnim faktorjem ni priporočljiva, saj na pretvorbeni faktor vplivajo izooblika apo(a), postavljena mejna vrednost in uporabljena metoda za merjenje (60).



Slika 4: Določanje koncentracije lipoproteina(a) (Lp(a)) z imunskimi testi. Koncentracija Lp(a) je obratno sorazmerna velikosti izooblike apolipoproteina(a) (apo(a)). Uporaba kalibratorjev z različnimi velikostmi izooblike apo(a) omogoči ujemanje kliničnega vzorca z visoko koncentracijo Lp(a) s kalibratorjem z majhno izoobliko apo(a) in obratno. Prirejeno po (60). Slika je bila pripravljena s spletnim orodjem BioRender.com.

Figure 4: Assessment of lipoprotein(a) (Lp(a)) concentration using immunoassays. The concentration of Lp(a) is inversely proportional to the size of the apolipoprotein(a) (apo(a)) isoform. The use of calibrators with different sizes of apo(a) isoform allows a clinical sample with a high concentration of Lp(a) to be matched with a calibrator with a small apo(a) isoform and vice versa. Adapted from (60). Created with BioRender.com.

SMERNICE ZA DOLOČANJE LIPOPROTEINA(a)

Glede na našete omejitve, ki ostajajo pri določanju koncentracije Lp(a), tudi mejna vrednost za povečano tveganje za srčno-žilne bolezni še ni dokončno določena. V zač-

tnih raziskavah je bila mejna vrednost postavljena na 300 mg/L (64). To vrednost so uporabljale tudi številne druge raziskave, predlagana pa je bila tudi višja mejna vrednost, in sicer 500 mg/L (65). Podajanje v molskih enotah je sicer bolj pravilno, vendar se zaradi številnih raziskav, ki so uporabljale masne enote, in odsotnosti enostavne pretvorbe, še vedno pogosto navajajo masne enote. Najnovejše mednarodne smernice glede določanja Lp(a) so povze- »

te v Tabeli 1. Smernice različnih združenj se razlikujejo v različnih mejnih vrednostih, pa tudi v prognostični in diagnostični uporabnosti določanja Lp(a). Nekatere predlagajo določanje Lp(a) samo pri posameznikih s povečanim

tveganjem za srčno-žilne bolezni, druge, med njimi tudi evropska, predlagajo določanje Lp(a) vsaj enkrat v življenju vsakega posameznika.

Tabela 1: Najnovejša mednarodna priporočila za merjenje lipoproteina(a) in mejne vrednosti za povečano tveganje za srčno-žilne bolezni.

Table 1: The latest international recommendations for lipoprotein(a) measurement and cut-off values for increased risk for cardiovascular diseases.

Smernice	Tarčna populacija	Mejna vrednost
European Society of Cardiology and European Atherosclerosis Society EAS/ESC 2019 (66)	1.) Splošno presejanje: vsaj enkrat v življenju za prepoznavanje posameznikov, ki so podedovali ekstremno povišane vrednosti Lp(a). 2.) Tarčno presejanje: pri posameznikih s povečanim tveganjem za ASŽB oz. zgodovina prezgodnje ASŽB v družini oz. ocenjeno tveganje za ASŽB v desetletnem obdobju.	zelo visoko tveganje: Lp(a) \geq 1800 mg/L ali \geq 430 nmol/L
American Heart Association and American College of Cardiology AHA/ACC 2018 (67)	1.) Zgodovina prezgodnje ASŽB v družini. 2.) Zgodovina prezgodnje ASŽB pri posamezniku, ki je ni mogoče pojasniti z ostalimi glavnimi dejavniki tveganja.	Lp(a) \geq 500 mg/L ali \geq 125 nmol/L
HEART-UK 2019 (68)	1.) Zgodovina prezgodnje ASŽB v družini. 2.) Sorodnik v prvem kolenu z Lp(a) > 200 nmol/L. 3.) Pacienti z družinsko hiperholesterolemijo, stenozo zaklopk ali visokim tveganjem za kardiovaskularni dogodek v desetletnem obdobju.	majhno tveganje: 32–90 nmol/L srednje: 90–200 nmol/L visoko: 200–400 nmol/L zelo visoko: > 400 nmol/L
National Lipid Association NLA 2019 (69)	1.) Tarčno presejanje družinskih članov pacienta s hudo hiperholesterolemijo (LDL \geq 190 mg/dL) ali zgodovina prezgodnje ASŽB pri posamezniku. 2.) Pri mladih (< 20 let) s kliničnim sumom ali genetsko potrjeno družinsko hiperholesterolemijo oz. sorodnik v prvem kolenu z zgodovino prezgodnje ASŽB oz. starš ali sorojenec z Lp(a) \geq 50 mg/dL ali \geq 100 nmol/L.	Lp(a) \geq 500 mg/L ali \geq 100 nmol/L
Canadian Cardiovascular Society CCS 2021 (70)	Enkrat v življenju posameznika kot del začetnega lipidnega presejanja.	Lp(a) > 500 mg/L ali > 100 nmol/L

ASŽB, aterosklerotična srčno-žilna bolezen; Lp(a), lipoprotein(a).



TERAPEVTSKE MOŽNOSTI ZA ZNIŽEVANJE KONCENTRACIJE LIPOPROTEINA(a)

Povišana koncentracija Lp(a) je že dolgo znana kot neodvisni dejavnik tveganja ne glede na vrednost holesterola LDL, vendar zdravil, ki bi specifično zniževala Lp(a), trenutno še ni v klinični uporabi. Za zniževanje holesterola LDL se najpogosteje uporabljajo statini, ki koncentracije Lp(a) ne znižajo. Nasprotno, nekatere raziskave so celo pokazale, da se koncentracija Lp(a) nekoliko zviša (0–10 %), kar naj bi bilo odvisno od izoblike apo(a) (71), vendar neodvisno od vrste ali odmerka statinov (72).

V zadnjih nekaj letih so na voljo zdravila, ki vplivajo na zmanjšanje koncentracije proste proteina konvertaze subtilisin/keksin tipa 9 (PCSK9, okr. angl. *proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*). PCSK9 je sicer odgovoren za razgradnjo LDLR, in s tem vpliva na zmanjšanje privzema holesterola LDL iz krvi v celice. Na še ne povsem pojasnjen način pa znižujejo tudi koncentracijo Lp(a). Zaviralci PCSK9 so monoklonska protitelesa, ki zmanjšujejo koncentracijo PCSK9 v krvi. Hepatociti niso edini izvor PCSK9, saj ta nastaja tudi v tankem črevesu, ledvicah, endotelijskih celicah, gladkomišičnih celicah krvnih žil ter v monocitih in makrofagih v aterosklerotični lehi. Na drugi strani je inclisiran zdravilo, ki zavira nastanek PCSK9 samo znotraj jetrnih celic (73). Zdravila iz obeh skupin učinkovito znižujejo holesterol LDL za 40 do 60 % in tudi Lp(a) od 15 do 35 %. Vendar pa imamo le za zdravila iz skupine zaviralcev PCSK9 dokaze, da poleg znižanja koncentracije holesterola LDL in Lp(a) zmanjšajo tudi pojavnost srčno-žilne obolenosti in umrljivosti (74, 75). Podobna raziskava z inclisiranom še poteka in rezultate pričakujemo v letu 2025 (76).

Pri zniževanju koncentracije lipoproteinov, ki vsebujejo apoB, je zelo učinkovita afereza, saj je takoj po koncu koncentracija Lp(a) znižana za do 70 % (77). Afereza tudi zmanjša tveganje za srčno-žilne dogodke (78), vendar je to precej drag in časovno zamuden postopek, saj morajo bolniki dobivati terapijo na vsaka dva tedna. Med terapijama je znižanje koncentracije Lp(a) sicer bolj v območju 35 %. Afereza lipoproteinov povzroča veliko nihanje koncentracije Lp(a), kar je tudi

eden od potencialnih dejavnikov tveganja za srčno-žilne bolezni (77). Koncentracijo Lp(a) znižujejo tudi niacin (20 %) (79) in zaviralci holesterilester prenašalnega proteina (CETP, okr. angl. *cholesteryl ester transfer protein*) (do 25 %) (80, 81), vendar znižanje ne vpliva na zmanjšanje tveganja za srčno-žilne bolezni.

Trenutne raziskave se osredotočajo na učinkovine proti mRNA gena *LPA*, kot so protismiselni oligonukleotidi (ASO, okr. angl. *antisense oligonucleotides*) in male interferirajoče RNA (siRNA, okr. angl. *small interfering RNAs*). ASO in siRNA se v jetrih specifično vežejo na mRNA gena *LPA* in tako zavirajo sintezo apo(a) ter s tem Lp(a). Trenutno potekajo klinične raziskave za tri take terapevtske učinkovine: Pelacarsen, Olpasiran in SLN360. Pelacarsen deluje kot ASO. V fazi 2 kliničnih raziskav se je koncentracija Lp(a) znižala za 35 do 80 %, trenutno poteka faza 3 kliničnih raziskav (82). Olpasiran in SLN360 pa sta siRNA, ki sta trenutno v fazi 2 kliničnih raziskav. V fazi 1 je Olpasiran znižal koncentracijo Lp(a) za 70 do 95 % (83), SLN360 pa za 46 do 98 % (84). Rezultati kažejo, da je gensko zdravljenje tako precej bolj učinkovito v primerjavi s trenutnimi zdravilnimi učinkovinami in predstavlja obetajoč pristop za zniževanje koncentracije Lp(a). Seveda pa je treba še zaključiti vse faze kliničnih raziskav in potrditi varno uporabo in komplianco teh zdravil ter dejanski prispevek k zmanjšanju tveganja za srčno-žilne bolezni.

ZAKLJUČEK

Koncentracija Lp(a) je ena najbolj podedovanih kvantitativnih lastnosti pri človeku, saj genetske spremembe v genu *LPA* razložijo 90 % variabilnosti v koncentraciji Lp(a) med posamezniki. Lp(a) deluje proaterogeno, provnetno in protrombotično ter prispeva k začetku številnih patofizioloških procesov in tudi napredovanju bolezni. Povišane vrednosti Lp(a) so neodvisni in vzročni dejavnik za aterosklerotične srčno-žilne bolezni in stenozo aortne zaklopke. Večina oseb s povečanim tveganjem za srčno-žilne bolezni (70–80 %) ima sicer holesterol LDL v precej višjih koncentracijah kot Lp(a), zato k tveganju v največji meri prispeva holesterol LDL. Vendar, ko koncentracija Lp(a) preseže 300 mg/L, kar je pri 20 do 30 % populacije, tveganje zaradi Lp(a) narašča linearno glede na absolutno maso Lp(a) v krvnem obtoku (85). Merjenje Lp(a) še vedno ni povsem standardizirano, vseeno pa so trenutno do- »

segeljive laboratorijske metode, opisane v tem prispevku, klinično uporabne za določanje povečanega tveganja za srčno-žilne bolezni. Ko bodo na voljo učinkovite in varne terapevtske možnosti, bo določanje Lp(a) predvidoma bolj pogosto tudi v kliničnih laboratorijih na sekundarni in terciarni ravni.

LITERATURA

- Townsend N, Nichols M, Scarborough P, Rayner M. Cardiovascular disease in Europe —epidemiological update 2015. *Eur Heart J*. 2015;36(40):2696-705.
- Iannuzzo G, Tripaldella M, Mallardo V, Morgillo M, Vitelli N, Iannuzzi A, et al. Lipoprotein(a) where do we stand? From the physiopathology to innovative therapy. *Biomedicines*. 2021;9(7):838.
- Berg K. A new serum type system in man - the LP system. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1963;59:369-82.
- Sofi F, Marcucci R, Abbate R, Gensini GF, Prisco D. Lipoprotein (a) and venous thromboembolism in adults: a meta-analysis. *Am J Med*. 2007;120(8):728-33.
- Kronenberg F, Utermann G. Lipoprotein(a): resurrected by genetics. *J Intern Med*. 2013;273(1):6-30.
- Lackner C, Cohen JC, Hobbs HH. Molecular definition of the extreme size polymorphism in apolipoprotein(a). *Hum Mol Genet*. 1993;2(7):933-40.
- Kraft HG, Menzel HJ, Hoppichler F, Vogel W, Utermann G. Changes of genetic apolipoprotein phenotypes caused by liver transplantation. Implications for apolipoprotein synthesis. *J Clin Invest*. 1989;83(1):137-42.
- Wang J, White AL. Role of N-linked glycans, chaperone interactions and proteasomes in the intracellular targeting of apolipoprotein(a). *Biochem Soc Trans*. 1999;27(4):453-8.
- Brunner C, Lobentanz EM, Pethö-Schramm A, Ernst A, Kang C, Dieplinger H, et al. The number of identical kringle IV repeats in apolipoprotein(a) affects its processing and secretion by HepG2 cells. *J Biol Chem*. 1996;271(50):32403-10.
- Utermann G, Menzel HJ, Kraft HG, Duba HC, Kemmler HG, Seitz C. Lp(a) glycoprotein phenotypes. Inheritance and relation to Lp(a)-lipoprotein concentrations in plasma. *J Clin Invest*. 1987;80(2):458-65.
- Youssef A, Clark JR, Marcovina SM, Boffa MB, Koschinsky ML. Apo(a) and ApoB interact noncovalently within hepatocytes: Implications for regulation of Lp(a) levels by modulation of ApoB secretion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2022;42:289-304.
- Frank S, Durovic S, Kostner GM. Structural requirements of apo-a for the lipoprotein-a assembly. *Biochem J*. 1994;304(Pt 1):27-30.
- Hoover-Plow J, Huang M. Lipoprotein(a) metabolism: potential sites for therapeutic targets. *Metabolism*. 2013;62(4):479-91.
- McCormick SPA, Schneider WJ. Lipoprotein(a) catabolism: a case of multiple receptors. *Pathology*. 2019;51(2):155-64.
- Vuorio A, Watts GF, Schneider WJ, Tsimikas S, Kovanen PT. Familial hypercholesterolemia and elevated lipoprotein(a): double heritable risk and new therapeutic opportunities. *J Intern Med*. 2020;287(1):2-18.
- Sharma M, Redpath GM, Williams MJ, McCormick SP. Recycling of apolipoprotein(a) after PlgRKT-mediated endocytosis of lipoprotein(a). *Circ Res*. 2017;120(7):1091-102.
- Rubin J, Kim HJ, Pearson TA, Holleran S, Berglund L, Ramakrishnan R. The apolipoprotein(a) gene: linkage disequilibria at three loci differs in African Americans and Caucasians. *Atherosclerosis*. 2008;201(1):138-47.
- Leischik R, Dworrak B. Lipoprotein(a): importance for the fibrinolytic system and thromboembolic complications. *Herz*. 2006;31(2):144-52.
- Forbes CA, Quek RG, Deshpande S, Worthy G, Wolff R, Stirk L, et al. The relationship between Lp(a) and CVD outcomes: a systematic review. *Lipids Health Dis*. 2016;15:95.
- Umahara T, Uchihara T, Yamada S, Hashimoto T, Akimoto J, Haraoka J, et al. Differential expression of oxidized/native lipoprotein(a) and plasminogen in human carotid and cerebral artery plaques. *Atherosclerosis*. 2011;215(2):392-8.
- Wiesner P, Tafelmeier M, Chittka D, Choi SH, Zhang L, Byun YS, et al. MCP-1 binds to oxidized LDL and is carried by lipoprotein(a) in human plasma. *J Lipid Res*. 2013;54(7):1877-83.
- Allen S, Khan S, Tam S, Koschinsky M, Taylor P, Yacoub M. Expression of adhesion molecules by Lp(a): a potential novel mechanism for its atherogenicity. *FASEB J*. 1998;12(15):1765-76.
- O'Neil CH, Boffa MB, Hancock MA, Pickering JG, Koschinsky ML. Stimulation of vascular smooth muscle cell proliferation and migration by apolipoprotein(a) is dependent on inhibition of transforming growth factor-beta activation and on the presence of kringle IV type 9. *J Biol Chem*. 2004;279(53):55187-95.
- Leibundgut G, Scipione C, Yin H, Schneider M, Boffa MB, Green S, et al. Determinants of binding of oxidized phospholipids on apolipoprotein (a) and lipoprotein (a). *J Lipid Res*. 2013;54(10):2815-30.
- Cho T, Jung Y, Koschinsky ML. Apolipoprotein(a), through its strong lysine-binding site in KIV(10'), mediates increased endothelial cell contraction and permeability via a Rho/Rho kinase/MYPT1-dependent pathway. *J Biol Chem*. 2008;283(45):30503-12.
- Boffa MB, Koschinsky ML. Lipoprotein (a): truly a direct prothrombotic factor in cardiovascular disease? *J Lipid Res*. 2016;57(5):745-57.
- Kamstrup PR, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Elevated lipoprotein(a) and risk of aortic valve stenosis in the general population. *J Am Coll Cardiol*. 2014;63(5):470-7.
- Capoulade R, Yeang C, Chan KL, Pibarot P, Tsimikas S. Association of mild to moderate aortic valve stenosis progression with higher lipoprotein(a) and oxidized phospholipid levels: Secondary analysis of a randomized clinical trial. *JAMA Cardiol*. 2018;3(12):1212-7.
- Pawade TA, Newby DE, Dweck MR. Calcification in aortic stenosis: The skeleton key. *J Am Coll Cardiol*. 2015;66(5):561-77.
- Zheng KH, Tsimikas S, Pawade T, Kroon J, Jenkins WSA, Doris MK, et al. Lipoprotein(a) and oxidized phospholipids promote valve calcification in patients with aortic stenosis. *J Am Coll Cardiol*. 2019;73(17):2150-62.
- Bourgeois R, Devillers R, Perrot N, Després AA, Boulanger MC, Mitchell PL, et al. Interaction of autotaxin with lipoprotein(a) in patients with calcific aortic valve stenosis. *JACC Basic Transl Sci*. 2020;5(9):888-97.
- Lackner C, Boerwinkle E, Leffert CC, Rahmig T, Hobbs HH. Molecular basis of apolipoprotein (a) isoform size heterogeneity as revealed by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Invest*. 1991;87(6):2153-61. >>

33. Coassin S, Kronenberg F. Lipoprotein(a) beyond the kringle IV repeat polymorphism: The complexity of genetic variation in the *LPA* gene. *Atherosclerosis*. 2022;349:17-35.
34. Rehberger Likozar A, Blinc A, Trebušak Podkrajšek K, Šebešljen M. *LPA* genotypes and haplotypes are associated with lipoprotein(a) levels but not arterial wall properties in stable post-coronary event patients with very high lipoprotein(a) levels. *J Cardiovasc Dev Dis*. 2021;8(12):181.
35. Coassin S, Schönherr S, Weissensteiner H, Erhart G, Forer L, Losso JL, et al. A comprehensive map of single-base polymorphisms in the hypervariable *LPA* kringle IV type 2 copy number variation region. *J Lipid Res*. 2019;60(1):186-99.
36. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116(2):281-97.
37. Fernández-Tussy P, Ruz-Maldonado I, Fernández-Hernando C. MicroRNAs and circular RNAs in lipoprotein metabolism. *Curr Atheroscler Rep*. 2021;23(7).
38. Zhu L, Li N, Sun L, Zheng D, Shao G. Non-coding RNAs: The key detectors and regulators in cardiovascular disease. *Genomics*. 2021;113(1):1233-46.
39. Zeng JF, Zeng ZL, Zhang K, Zhao Y, Liu YM, Chen JJ, et al. miR-23b-3p and miR-125b-5p downregulate apo(a) expression by targeting *Ets1* in HepG2 cells. *Cell Biol Int*. 2018;42(3):313-23.
40. Langsted A, Kamstrup PR, Nordestgaard BG. Lipoprotein(a): fasting and nonfasting levels, inflammation, and cardiovascular risk. *Atherosclerosis*. 2014;234(1):95-101.
41. Wang XL, Wilcken DEL, Dudman NPB. Early expression of the apolipoprotein (a) gene: Relationships between infants' and their parents' serum apolipoprotein (a) levels. *Pediatrics*. 1992;89(3):401-6.
42. Rifai N, Heiss G, Doetsch K. Lipoprotein(a) at birth, in blacks and whites. *Atherosclerosis*. 1992;92(2-3):123-9.
43. de Boer LM, Hof MH, Wiegman A, Stroobants AK, Kastelein JJP, Hutten BA. Lipoprotein(a) levels from childhood to adulthood: Data in nearly 3,000 children who visited a pediatric lipid clinic. *Atherosclerosis*. 2022;349:227-32.
44. Kamstrup PR, Tybjaerg-Hansen A, Steffensen R, Nordestgaard BG. Genetically elevated lipoprotein(a) and increased risk of myocardial infarction. *JAMA*. 2009;301(22):2331-9.
45. Jenner JL, Ordovas JM, Lamon-Fava S, Schaefer MM, Wilson PW, Castelli WP, et al. Effects of age, sex, and menopausal status on plasma lipoprotein(a) levels. The Framingham Offspring Study. *Circulation*. 1993;87(4):1135-41.
46. Enkhmaa B, Berglund L. Non-genetic influences on lipoprotein(a) concentrations. *Atherosclerosis*. 2022;349:53-62.
47. Anagnostis P, Antza C, Trakatelli C, Lambrinoukaki I, Goulis DG, Kotsis V. The effect of menopause on lipoprotein (a) concentrations: A systematic review and meta-analysis. *Maturitas*. 2022;167:39-45.
48. Anagnostis P, Galanis P, Chatzistergiou V, Stevenson JC, Godsland IF, Lambrinoukaki I, et al. The effect of hormone replacement therapy and tibolone on lipoprotein (a) concentrations in postmenopausal women: A systematic review and meta-analysis. *Maturitas*. 2017;99:27-36.
49. Zegura B, Guzic-Salobir B, Sebestjen M, Keber I. The effect of various menopausal hormone therapies on markers of inflammation, coagulation, fibrinolysis, lipids, and lipoproteins in healthy postmenopausal women. *Menopause*. 2006;13(4):643-50.
50. Zechner R, Desoye G, Schweditsch MOP, Karl P, Kostner GM. Fluctuations of plasma lipoprotein-A concentrations during pregnancy and post partum. *Metabolism*. 1986;35(4):333-6.
51. Mehta A, Jain V, Saeed A, Saseen JJ, Gulati M, Ballantyne CM, et al. Lipoprotein(a) and ethnicities. *Atherosclerosis*. 2022;349:42-52.
52. Kronenberg F. Causes and consequences of lipoprotein(a) abnormalities in kidney disease. *Clin Exp Nephrol*. 2014;18(2):234-7.
53. Kronenberg F, Utermann G, Dieplinger H. Lipoprotein(a) in renal disease. *Am J Kidney Dis*. 1996;27(1):1-25.
54. Kimak E, Solski J. Serum lipoprotein(a) concentrations and apolipoprotein(a) phenotypes in hemodialysis, chronic ambulatory peritoneal dialysis and post-transplant patients. *Ren Fail*. 2002;24(2):187-95.
55. Choe YG, Jin W, Cho YK, Chung WG, Kim HJ, Jeon WK, et al. Apolipoprotein B/AI ratio is independently associated with non-alcoholic fatty liver disease in nondiabetic subjects. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013;28(4):678-83.
56. Jiang J, Zhang X, Wu C, Qin X, Luo G, Deng H, et al. Increased plasma apoM levels in the patients suffered from hepatocellular carcinoma and other chronic liver diseases. *Lipids Health Dis*. 2008;7:25.
57. Klezovitch O, Edelstein C, Scanu AM. Stimulation of interleukin-8 production in human THP-1 macrophages by apolipoprotein(a). Evidence for a critical involvement of elements in its C-terminal domain. *J Biol Chem*. 2001;276(50):46864-9.
58. Ramharack R, Barkalov D, Spahr MA. Dominant negative effect of TGF-beta1 and TNF-alpha on basal and IL-6-induced lipoprotein(a) and apolipoprotein(a) mRNA expression in primary monkey hepatocyte cultures. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18(6):984-90.
59. Schmidt K, Noureen A, Kronenberg F, Utermann G. Structure, function, and genetics of lipoprotein (a). *J Lipid Res*. 2016;57(8):1339-59.
60. Kronenberg F. Lipoprotein(a) measurement issues: Are we making a mountain out of a molehill? *Atherosclerosis*. 2022;349:123-35.
61. Marcovina SM, Albers JJ, Gabel B, Koschinsky ML, Gaur VP. Effect of the number of apolipoprotein(a) kringle 4 domains on immunochemical measurements of lipoprotein(a). *Clin Chem*. 1995;41(2):246-55.
62. Marcovina SM, Clouet-Foraison N, Koschinsky ML, Lowenthal MS, Orquillas A, Boffa MB, et al. Development of an LC-MS/MS proposed candidate reference method for the standardization of analytical methods to measure lipoprotein(a). *Clin Chem*. 2021;67(3):490-9.
63. Mooser V, Marcovina SM, White AL, Hobbs HH. Kringle-containing fragments of apolipoprotein(a) circulate in human plasma and are excreted into the urine. *J Clin Invest*. 1996;98(10):2414-24.
64. Kostner GM, Avogaro P, Cazzolato G, Marth E, Bittolo-Bon G, Quinici GB. Lipoprotein Lp(a) and the risk for myocardial infarction. *Atherosclerosis*. 1981;38(1-2):51-61.
65. Nordestgaard BG, Chapman MJ, Ray K, Borén J, Andreotti F, Watts GF, et al. Lipoprotein(a) as a cardiovascular risk factor: current status. *Eur Heart J*. 2010;31(23):2844-53.
66. Authors/Task Force Members, ESC Committee for Practice Guidelines (CPG), ESC National Cardiac Societies. 2019 ESC/EAS guidelines for the management of dyslipidaemias: Lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Atherosclerosis*. 2019;290:140-205.
67. Arnett DK, Blumenthal RS, Albert MA, Buroker AB, Goldberger ZD, Hahn EJ, et al. 2019 ACC/AHA guideline on the primary prevention >>

- of cardiovascular disease: Executive summary: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association task force on clinical practice guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2019;74(10):1376-414.
68. Cegla J, Neely RDG, France M, Ferns G, Byrne CD, Halcox J, et al. HEART UK consensus statement on Lipoprotein(a): A call to action. *Atherosclerosis*. 2019;291:62-70.
 69. Wilson DP, Jacobson TA, Jones PH, Koschinsky ML, McNeal CJ, Nordestgaard BG, et al. Use of Lipoprotein(a) in clinical practice: A biomarker whose time has come. A scientific statement from the National Lipid Association. *J Clin Lipidol*. 2019;13(3):374-92
 70. Pearson GJ, Thanassoulis G, Anderson TJ, Barry AR, Couture P, Dayan N, et al. 2021 Canadian Cardiovascular Society guidelines for the management of dyslipidemia for the prevention of cardiovascular disease in adults. *Can J Cardiol*. 2021;37(8):1129-50.
 71. Yahya R, Berk K, Verhoeven A, Bos S, van der Zee L, Touw J, et al. Statin treatment increases lipoprotein(a) levels in subjects with low molecular weight apolipoprotein(a) phenotype. *Atherosclerosis*. 2019;289:201-5.
 72. Zhu L, Fang Y, Gao B, Jin X, Zheng J, He Y, et al. Effect of an increase in Lp(a) following statin therapy on cardiovascular prognosis in secondary prevention population of coronary artery disease. *BMC Cardiovasc Disord*. 2022;22(1):474.
 73. Nishikido T, Ray KK. Inclisiran for the treatment of dyslipidemia. *Expert Opin Investig Drugs*. 2018;27(3):287-94.
 74. Sabatine MS, Giugliano RP, Keech AC, Honarpour N, Wiviott SD, Murphy SA, et al. Evolocumab and clinical outcomes in patients with cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 2017;376(18):1713-22.
 75. Robinson JG, Farnier M, Krempf M, Bergeron J, Luc G, Averna M, et al. Efficacy and safety of alirocumab in reducing lipids and cardiovascular events. *N Engl J Med*. 2015;372(16):1489-99.
 76. Stoekenbroek RM, Kallend D, Wijngaard PL, Kastelein JJ. Inclisiran for the treatment of cardiovascular disease: the ORION clinical development program. *Futur Cardiol*. 2018;14(6):433-42.
 77. Langsted A, Nordestgaard BG. Genetics of lipoprotein(a): Cardiovascular disease and future therapy. *Curr Atheroscler Rep*. 2021;23(8):46.
 78. Roeseler E, Julius U, Heigl F, Spitthoever R, Heutling D, Breitenberger P, et al. Lipoprotein apheresis for lipoprotein(a)-associated cardiovascular disease: Prospective 5 years of follow-up and apolipoprotein(a) characterization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016;36(9):2019-27.
 79. Sahebkar A, Reiner Z, Simental-Mendía LE, Ferretti G, Cicero AF. Effect of extended-release niacin on plasma lipoprotein(a) levels: A systematic review and meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. *Metabolism*. 2016;65(11):1664-78.
 80. Group HTRC, Bowman L, Hopewell JC, Chen F, Wallendszus K, Stevens W, et al. Effects of anacetrapib in patients with atherosclerotic vascular disease. *N Engl J Med*. 2017;377(13):1217-27.
 81. Bittner VA, Szarek M, Aylward PE, Bhatt DL, Diaz R, Edelberg JM, et al. Effect of alirocumab on lipoprotein(a) and cardiovascular risk after acute coronary syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 2020;75(2):133-44.
 82. Tsimikas S, Karwatowska-Prokopczuk E, Gouni-Berthold I, Tardif JC, Baum SJ, Steinhagen-Thiessen E, et al. Lipoprotein(a) reduction in persons with cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 2020;382(3):244-55.
 83. Koren MJ, Moriarty PM, Neutel J, Baum SJ, Hernandez-Illas M, Weintraub HS, et al. Safety, tolerability and efficacy of single-dose Amg 890, a novel siRNA targeting Lp(a), in healthy subjects and subjects with elevated Lp(a). *Circulation*. 2020;142:A13951.
 84. Nissen SE, Wolski K, Balog C, Swerdlow DI, Scrimgeour AC, Rambaran C, et al. Single ascending dose study of a short interfering RNA targeting lipoprotein(a) production in individuals with elevated plasma lipoprotein(a) levels. *JAMA*. 2022;327(17):1679-87.
 85. Tsimikas S. A test in context: Lipoprotein(a): Diagnosis, prognosis, controversies, and emerging therapies. *J Am Coll Cardiol*. 2017;69(6):692-711.