

Laboratorinė medicina.
2019, t. 21, Nr. 4(84), p. 181–186.

Cholesterolio išnašos geba ir laboratorinių jos vertinimo metodų apžvalga

Linās Černiauskas
Dovilė Karčiauskaitė

Santrauka

Atvirkštinė cholesterolio pernaša yra svarbus mokslinių tyrimų objektas nuo 1975 m., kai buvo paskelbta didelio tankio lipoproteinų (DTL) hipotezė, kurioje teigiama, kad DTL koncentracijos plazmoje sumažėjimas gali lemti greitesnį aterosklerozės vystymąsi bei nuo jos priklausomą išeminę širdies ligą, sutrikdydamas cholesterolio šalinimą iš arterijų sienelių. Dėl tuometinių metodų apribojimų tyrimų rezultatai, kurie patvirtina hipotezę, buvo paremti DTL cholesterolio koncentracijos, o ne DTL dalelių koncentracijos vertinimu. Dėl šios priežasties DTL cholesterolio koncentracija, bet ne DTL koncentracija tapo aterosklerozės bei širdies ir kraujagyslių ligų rizikos vertinimo žymeniu. Per paskutinius dvidešimt metų atlikti moksliniai tyrimai pateikė duomenų, kurie leidžia daryti prielaidą, jog DTL cholesterolio koncentracija nėra tinkamiausias šių ligų rizikos vertinimo žymuo. Pradėjus ieškoti šio reiškinio priežasčių iškilo DTL funkcinio tyrimų poreikis. Juos atliekant nustatyta, jog DTL dalelių vykdoma cholesterolio išnaša iš periferinių audinių ląstelių gali būti įvertinta kiekybiškai ir šis dydis pavadintas cholesterolio išnašos geba. Atliekant cholesterolio išnašos gebos mokslinius tyrimus išaiškėjo, jog šis dydis tikėtina yra nepriklausomas aterosklerozės bei širdies ir kraujagyslių ligų rizikos žymuo, suteikiantis papildomos informacijos apie cholesterolio homeostazę. Pastaruoju metu kuriami cholesterolio išnašos gebos vertinimo metodai, tačiau kol kas jų standartizacija yra sudėtinga, o gautų rezultatų variabilumas didelis dėl naudojamų skirtingų komponentų. Šiuos metodus svarbu tobulinti siekiant sukurti kasdieniame klinikinių laboratorijų darbe prieinamus cholesterolio išnašos gebos vertinimo metodus, kurie leistų atlikti didesnius populiacinius tyrimus ir nustatyti tikrąjį cholesterolio išnašos gebos potencialą vertinant individualią aterosklerozės bei širdies ir kraujagyslių ligų riziką.

Reikšminiai žodžiai: cholesterolis, atvirkštinė cholesterolio pernaša, cholesterolio išnašos geba, DTL funkciniai tyrimai, aterosklerozė, širdies ir kraujagyslių ligos.

ĮVADAS

Didelio tankio lipoproteinai (DTL) yra svarbūs palaikant cholesterolio homeostazę žmogaus organizme. Viena iš pagrindinių jų funkcijų yra atvirkštinė cholesterolio pernaša, kurios metu perteklinis cholesterolis iš periferinių audinių ląstelių yra pernešamas į jo katabolizmo vietas kepenyse bei ste-

roidogeniniuose audiniuose [1]. Sutrikus šiam procesui cholesterolis bei jo esteriai kaupiasi periferinių audinių ląstelėse ir arterijų sienelėse. Didelė laisvo cholesterolio koncentracija yra toksiška ląstelėms, o jo kaupimasis arterijų sienelėse gali lemti aterosklerozės vystymąsi bei su ja susijusias komplikacijas [2]. Mokslinėse laboratorijose ypač daug dėmesio skiriama choles-

Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto
Biomedicinos mokslų instituto
Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos
ir laboratorinės medicinos katedra,
M. K. Čiurlionio g. 21/27,
LT-03101 Vilnius

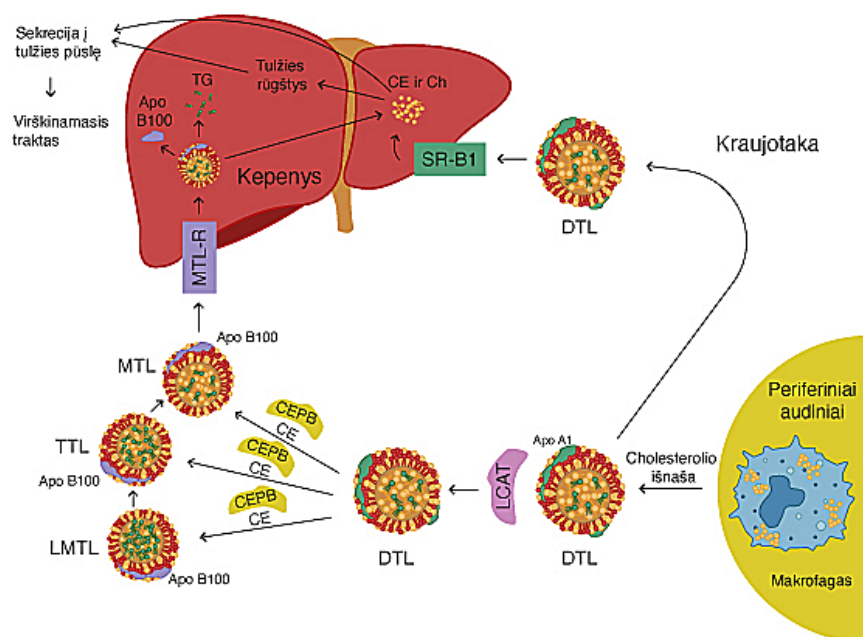
Department of Physiology,
Biochemistry, Microbiology
and Laboratory Medicine, Institute
of Biomedical Sciences, Faculty
of Medicine, Vilnius University,
M. K. Čiurlionio str. 21/27,
LT-03101 Vilnius, Lithuania

El. paštas:
linas.cerniauskas@mf.stud.vu.lt

terolio išnašai iš arterijų sienelėje esančių makrofagų į DTL. Išnašos metu DTL dalelės pasisavina cholesterolį iš jo kaupimo vietų arterijos sienelėje pasyvios difuzijos bei nuo specifinių pernašos baltymų ar receptorių priklausomais būdais [3]. Kiekybinis dydis, leidžiantis įvertinti šio proceso efektyvumą, vadinamas cholesterolio išnašos geba. Sukurti cholesterolio išnašos gebos vertinimo metodai yra pagrįsti specifine žyme žymėto cholesterolio analogo pernaša iš ląstelių ar liposomų į žmogaus kraujo serume esančius DTL [3–6]. Per du praėjusius dešimtmečius padaugėjo mokslinių tyrimų, kurių duomenys parodė, jog padidinus DTL cholesterolio koncentraciją širdies ir kraujagyslių ligų rizika nesumažėja [7–11]. Besigilinant į šio reiškinio priežastis buvo pradėti DTL funkciniai tyrinėjimai, ir vienas iš pagrindinių tyrimo objektų – cholesterolio išnašos geba, kuri galėtų būti naudinga diagnozuojant širdies ir kraujagyslių ligas bei vertinant jų riziką. Šio straipsnio tikslas – apžvelgti atvirkštinės cholesterolio pernašos mechanizmą, laboratorijų galimybes ištirti cholesterolio išnašos gebą bei galimą šio rodiklio taikymą širdies ir kraujagyslių ligų rizikai vertinti bei joms diagnozuoti.

ATVIRKŠTINĖ CHOLESTEROLIO PERNAŠA ŽMOGAUS ORGANIZME

Atvirkštinė cholesterolio pernaša – tai procesas, kurio metu DTL pasisavina cholesterolį iš periferinių audinių ir perneša jį į kepenis, kur šis metabolizuojamas (1 pav.) [3, 12]. Specifinė atvirkštinės cholesterolio pernašos dalis yra cholesterolio išnaša iš makrofagų į DTL – pirmas atvirkštinės cholesterolio pernašos etapas [12]. Žinoma, jog makrofagai cholesterolį išneša į DTL keturiais būdais: nuo „šiukšles surenkantis“ receptoriaus B1 (SR-B1), ATP surišančios kasetės pernašos baltymo A1 (ABCA1), ATP surišančios kasetės pernašos baltymo G1 (ABCG1) priklausomais bei pasyvios difuzijos būdais (2 pav.) [13, 14]. Nuo SR-B1 priklausomas išnašos kelias bei pasyvi difuzija yra pasyvios cholesterolio išnašos būdai, priklausantys nuo cholesterolio koncentracijos gradiento. ABCA1 bei ABCG1 yra aktyvios cholesterolio išnašos būdai, kuriems būtina ATP hidrolizei vykstant išsiskirianti energija, ir jie yra nepriklausomi nuo cholesterolio koncentracijos gradiento [15]. Šiandien minėtų pernašos būdų mechanizmai nėra iki galo



1 pav. Atvirkštinė cholesterolio pernaša žmogaus organizme

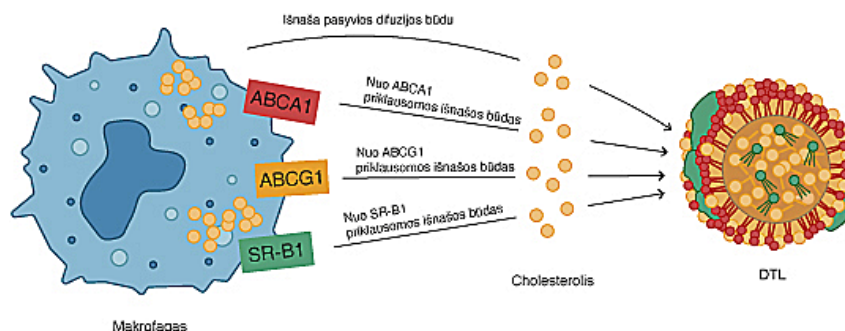
Apo A1 – apoproteinas A1, Apo B100 – apoproteinas B100, CE – cholesterolio esteriai, CEPC – cholesterolio esterų pernašos baltymas, Ch – cholesterolis, DTL – didelio tankio lipoproteinas, LCAT – lecitino-cholesterolio aciltransferazė, LMTL – labai mažo tankio lipoproteinas, MTL – mažo tankio lipoproteinas, MTL-R – mažo tankio lipoproteinų receptorių, TG – triacilgliceroliai, SR-B1 – „šiukšles surenkantis“ receptorių B1.

Fig. 1. Reverse cholesterol transport in humans

Apo A1 – apoprotein A1, Apo B100 – apoprotein B100, CE – cholesteryl esters, CEPC (CETP) – cholesteryl ester transfer protein, Ch – cholesterol, DTL (HDL) – high-density lipoprotein, LCAT – lecithin-cholesterol acyltransferase, LMTL (VLDL) – very low-density lipoprotein, MTL (LDL) – low-density lipoprotein, MTL-R (LDL-R) – low-density lipoprotein receptor, TG – triacylglycerols, SR-B1 – scavenger receptor class B type 1

aiškūs, tačiau Yvan-Charvet su kolegomis [14] parodė, jog makrofaguose inaktyvinant ABCA1 bei ABCG1 baltymus koduojančius genus cholesterolio išnaša iš makrofagų į DTL sumažėja ~ 60 %, todėl manoma, jog nuo šių baltymų priklausomi išnašos keliai yra svarbiausi bendram cholesterolio išnašos procesui [14]. Cirkuliuojančios DTL dalelės sąveikaudamos su cholesterolio pernašos baltymais ar pasyvios difuzijos būdu pasisavina perteklinį cholesterolį iš makrofagų [15]. Antrame atvirkštinės cholesterolio pernašos etape fermentas lecitino-cholesterolio aciltransferazė (LCAT), esanti DTL dalelėse, katalizuoja cholesterolio, esančio DTL membranoje, esterifikaciją.

reakciją. Esterifikuotas cholesterolis patenka į DTL lipidinę šerdį ir čia yra kaupiamas cholesterolio esterų (CE) pavidalu [1, 16]. DTL dalelės taip pat pasisavina ApoCII bei ApoE baltymus iš cirkuliuojančių labai mažo tankio lipoproteinų (LMTL) bei tarpinio tankio lipoproteinų (TTL) dalelių [16]. Paskutiniame atvirkštinės cholesterolio pernašos etape CE iš DTL dalelių yra pašalinami tiesioginiu arba netiesioginiu būdu. Tiesioginiu būdu šalinant CE DTL dalelė sąveikauja su kepenų ląstelėse esančių SR-B1 receptorių ir CE patenka į kepenų ląsteles [3]. Netiesioginiu būdu CE iš DTL dalelių yra pernešami į ApoB turinčius lipoproteinus: LMTL, MTL ir TTL. Tai



2 pav. Cholesterolio išnašos iš makrofagų ląstelių į DTL būdai

Fig. 2. Cholesterol efflux pathways from macrophages to HDL

atlieka cholesterolio esterių pernašos baltymas (CEPB). Galiausiai šios dalelės dėl Apo B100 baltymo yra atpažįstamos kepenų MTL receptoriaus ir patenka į kepenų ląsteles, kur jų turinys metabolizuojamas [16]. Iš kepenų perteklinis cholesterolis bei iš jo susintetintos tulžies rūgštys išskiriami į tulžies pūslę ir pašalinami iš organizmo per virškinamąjį traktą.

CHOLESTEROLIO IŠNAŠOS GEBOS VERTINIMO METODAI

Siekiant įvertinti cholesterolio išnašos gebą buvo sukurti metodai, kurie *in vitro* imituoja fiziologinį cholesterolio išnašos procesą. Pagrindiniai šių metodų komponentai yra: cholesterolio donoras, specifinė žymė žymėtas cholesterolis bei cholesterolio akceptorius. Cholesterolio išnašos geba vertinama keliais etapais (3 pav.):

1. Pasirinktas cholesterolio donoras prisotinamas specifine žyme žymėto cholesterolio analogo.

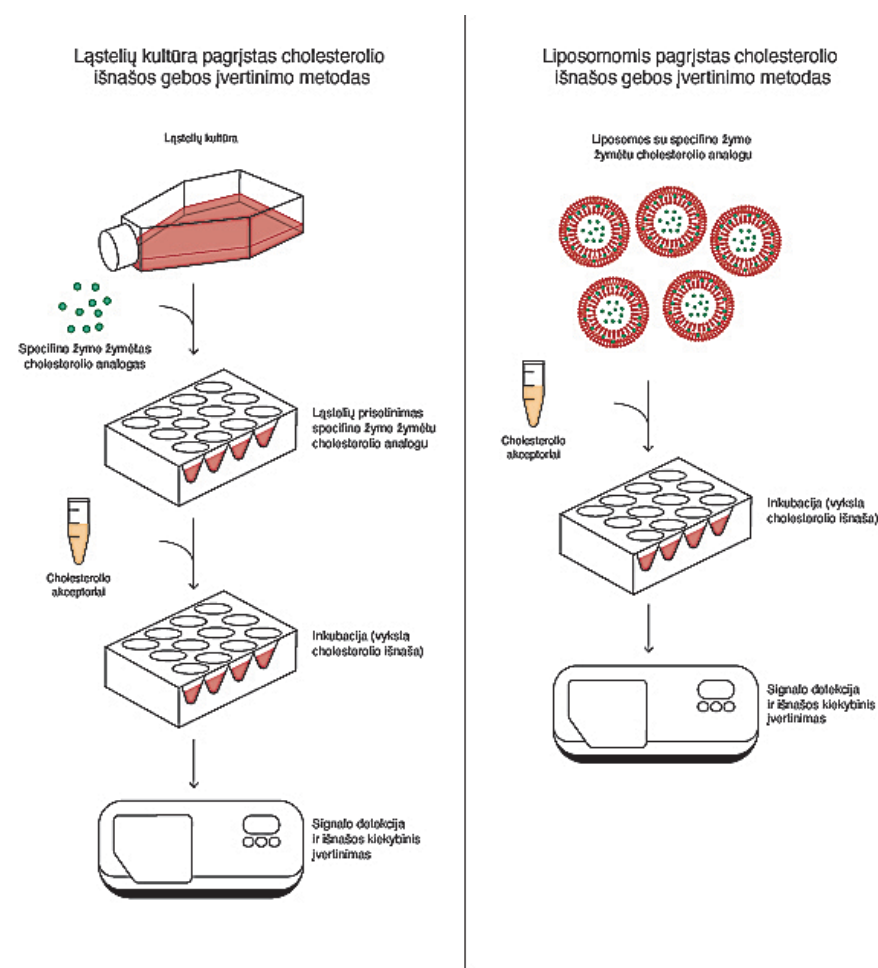
2. Paruošti cholesterolio akceptoriai inkubuojami su cholesterolio donoru. Inkubacijos metu vyksta cholesterolio išnaša iš donoro į akceptorius.

3. Cholesterolio donoriai ir akceptoriai yra atskiriami. Išmatuojamas žymėto cholesterolio signalas cholesterolio akceptoriuose bei cholesterolio donoruose. Procentinė išnašos vertė apskaičiuojama padalinus gautą cholesterolio akceptorius signalo vertę iš cholesterolio akceptorius signalo bei cholesterolio donoro signalų sumos.

$$\text{Išnaša (\%)} = \frac{\text{Signalas vertė}_{(\text{akceptorius})}}{\text{Signalas vertė}_{(\text{akceptorius})} + \text{Signalas vertė}_{(\text{donoro})}} \times 100 \, \%.$$

CHOLESTEROLIO DONORAI

Paprastai yra naudojami du pagrindiniai cholesterolio donoriai: ląstelių kultūros arba laboratorijoje susintetintos liposomos [3–5, 13]. Ląstelių kultūrų metodams dažniausiai pasirenkami cholesterolio donoriai yra makrofagų ląstelių linijos dėl jų tiesioginio dalyvavimo formuojantis aterosklerozinei plokštei bei gebėjimo vykdyti cholesterolio išnašą visais keturiais galimais būdais: pasyvios difuzijos būdu, SR-B1, ABCA1 bei ABCG1 [13, 17]. Ląstelių kultūromis pagrįstų metodų pranašumas yra tas, jog šie metodai leidžia tiksliai atkartoti cholesterolio išnašos procesą, kuris vyksta *in vivo*: tokie patys cholesterolio donoriai ir akceptoriai, išnaša vyksta tais pačiais išnašos būdais. Pagrindiniai šių metodų trūkumai yra didelės ląstelių kultūros kultivavimo sąnaudos, sudėtingas



3 pav. Ląstelių kultūromis bei liposomomis pagrįstų cholesterolio išnašos gebos vertinimo metodų pagrindiniai žingsniai

Fig. 3. Main steps of cholesterol efflux capacity measurement methods using cell cultures and liposomes

kultivavimo procedūrų bei išnašos vertinimo metodų standartizavimas, specifinio personalo mokymo poreikiai [18]. Svarbios problemos susijusios ir su ląstelių kultūros kultivavimo sutrikimu dėl bakterinių bei virusinių infekcijų, ilgo kultivavimo laiko ar poreikio ląstelių kultūrą išlaikyti šaldant. Ląstelių kultūrų metodų sąnaudos padidėja ir dėl papildomų reagentų: fermentų slopiklių bei išnašą vykdančių baltymų genų raiškos aktyviklių. Paprastai naudojami fermento Acil-KoA cholesterolio aciltransferazės (ACAT) slopikliai, kurie slopina šio fermento katalizuojamą laisvo cholesterolio esterifikacijos reakciją ląstelėse [19, 20]. Esterifikuotas cholesterolis negali būti pašalinamas iš ląstelių, todėl siekiant įvertinti cholesterolio išnašą reikia slopinti cholesterolio esterifikacijos procesą. Pasirenkami aktyvieniai priklauso nuo naudojamų ląstelių linijos, tačiau dažniausi yra steroliai ar

ciklinis adenosino monofosfatas (cAMP), kurie aktyvina cholesterolio išnašą vykdančių baltymų raišką [1, 13, 20].

Liposominiai metodai yra grindžiami sintetinėmis fosfolipidų dvisluoksnį turinčiomis dalelėmis, kurias sintetinant į jų vidų yra įterpiamas specifinė žymė žymėtas cholesterolis [5]. Šių metodų pagrindinis privalumas yra liposomų stabilumas: jos mažiau paveikios aplinkos sąlygų nei ląstelių kultūros. Pagrindinės sąnaudos yra susijusios tik su liposomų sinteze bei jai reikalingais reagentais ir yra mažesnės nei ilgalaikio ląstelių kultivavimo sąnaudos. Taip pat vienu metu galima susintetinti didelį kiekį cholesterolio donorų, o atitinkamam ląstelių kultūros kiekiui užauginti prireikia daugiau laiko [5]. Nepaisant kainos bei laiko privalumo, liposominiai metodai netiksliai atkartoja *in vivo* vykstančią cholesterolio išnašą: joje nedalyvauja cholesterolio išnašą vykdančys baltymai, todėl ji paremta tik cholesterolio akceptorius ir liposomų sąveika, kurios įtaka cholesterolio išna-

šai dar nėra aiški, bei pasyvios difuzijos būdu. Be to, reikalingas labai specifinio išsilavinimo personalas, kuris gebėtų standartizuoti ir prižiūrėti liposomų sintezės procesą bei įvertinti jo efektyvumą.

CHOLESTEROLIO IŠNAŠAI VERTINTI NAUDOJAMOS ŽYMĖS

Cholesterolio išnašai vertinti naudojami junginiai turi pasižymėti dviem savybėmis: jų molekulinė struktūra turi būti panaši į cholesterolio ir šie junginiai turi turėti specifinę žymę. Cholesterolio išnašai kiekybiškai įvertinti yra naudojamas įvairiomis žymėmis žymėtas cholesterolis arba jo analogai. Galima išskirti dvi pagrindines medžiagų grupes: fluoroforais žymėtas cholesterolis ir radioaktyviaisiais izotopais žymėtas cholesterolis [3–5]. Du dažniausiai cholesteroliui žymėti naudojami fluoroforai yra nitrobenzoksiazolas (NBD) bei boro dipirometas (BODIPY). Šių fluoroforų ir cholesterolio dariniai yra plačiai naudojami atliekant fluorescencinę mikroskopiją, stebint viduląstelinis pernašos procesus žinduolių ląstelėse, jie pasižymi dideliu ryškumu ir gebėjimu fluorescuoti regimosios šviesos bangų diapazone [21]. Pagrindiniai šių darinių trūkumai: išblukimas bei neaiškus sąveikos su cholesterolio pernašos baltymais mechanizmas. Reikia paminėti, jog BODIPY fluoroforo blukimo greitis yra mažesnis nei NBD [21]. Rečiau naudojama junginių grupė yra radioaktyviaisiais vandenilio [^3H] ar anglies [^{13}C] izotopais žymėtas cholesterolis [5, 13, 19]. Didžiausias tokio cholesterolio pranašumas yra jo identiška struktūra nežymėtos cholesterolio molekulės atžvilgiu, kas sumažina nepageidaujamų sąveikų tikimybę vykdant cholesterolio išnašą. Dėl šios savybės [^3H] žymėtu cholesteroliu pagrįsti cholesterolio išnašos vertinimo metodai yra laikomi aukso vertės standartu [22]. Nepaisant struktūros identiškumo, radioaktyviaisiais izotopais žymėtos molekulės vis rečiau naudojamos dėl galimo žalingo poveikio sveikatai bei reikalingos specialios įrangos signalui aptikti ir personalui apsaugoti.

CHOLESTEROLIO AKCEPTORIAI

Cholesterolio akceptoriais gali būti: visos sudėties kraujo serumas arba kraujo plazma, kraujo serumas be ApoB baltymus turinčių lipoproteinų (MTL, LMTL, TTL) bei iš kraujo serumo išskirti DTL [13]. Vienas geriausių

cholesterolio akceptorių yra kraujo serumas su iš jo pašalintais ApoB baltymus turinčiais lipoproteinais, kurie atlieka priešingą procesą matuojamai cholesterolio išnašai – cholesterolio pernašą į ląsteles. Nepašalinus ApoB turinčių lipoproteinų, CEC tyrimas nėra tikslus, nes matuojama bendra cholesterolio cirkuliacija tarp ląstelių ir cholesterolio akceptorių, o ne vienkryptis išnašos procesas.

Akceptorių savybės labai priklauso nuo ApoB baltymų turinčių lipoproteinų šalinimo metodo [23]. Dažniausi šių lipoproteinų šalinimo metodai yra nusodinimas cheminiais reagentais: polietilenglikoliu (PEG), dekstrano sulfatu ir magnio chloridu ($\text{DSO}_4/\text{MgCl}_2$), natrio heparinu ir mangano chloridu ($\text{NaHep}/\text{MnCl}_2$), bei imunoprecipitacijos (IP) būdu [23]. Davidson ir kolegos [23] parodė, jog efektyvus ApoB turinčių lipoproteinų pašalinimas būdingas visiems minėtiems nusodinimo metodams, tačiau mažiausias poveikis DTL dalelių populiacijai yra naudojant $\text{DSO}_4/\text{MgCl}_2$ bei $\text{NaHep}/\text{MnCl}_2$ [23]. Nusodinimo cheminiais reagentais metodai yra pigūs bei greitai, nereikalaujantys sudėtingos įrangos, todėl plačiai naudojami tyrimams. Taip pat yra labai svarbu įvertinti nusodinimui naudojamų cheminių reagentų poveikį DTL dalelių populiacijai, nes ši sudaryta iš skirtingų DTL poklasių, besiskiriančių savo dydžiu ir cholesterolio pasisavinimo geba [24]. Be ApoB turinčių lipoproteinų nusodinimo cheminiais reagentais, naudojami ir ultracentrifugavimu, chromatografija bei elektroforeze pagrįsti metodai, tačiau jie yra brangesni, užtrunka ilgiau bei jiems taikyti reikia papildomos įrangos [4, 19].

Pagrindinės problemos, su kuriomis susiduriama kuriant cholesterolio išnašos gebos vertinimo metodus, yra sudėtingas jų standartizavimas ir skirtingais metodais gautų rezultatų variabilumas. Dėl šių priežasčių metodus yra sudėtinga taikyti kasdiniame klinikinių laboratorijų darbe ir tai lemia, kad cholesterolio išnašos gebos didelių populiacinių tyrimų atlikta mažai.

CHOLESTEROLIO IŠNAŠOS GEBA – POTENCIALUS ATEROSKLEROZĖS RIZIKOS ŽYMUO

1975 m. Miller su kolegomis pirmieji pristatė DTL hipotezę, kurioje teigiama, kad DTL koncentracijos plazmoje sumažėjimas gali lemti greitesnį ate-

rosklerozės vystymąsi bei jos nulemtą išeminę širdies ligą, sutrikdydamas cholesterolio pašalinimą iš arterijų sienelių [25]. Remiantis hipoteze, atvirkštinė cholesterolio pernaša iš dalies priklauso nuo DTL koncentracijos plazmoje ir individams, kurie turi mažesnę DTL koncentraciją plazmoje, būdinga didesnė rizika susirgti koronarine širdies liga nei individams, kurių DTL koncentracija plazmoje yra didesnė [26]. Kadangi tuometiniais metodais nebuvo galima įvertinti DTL dalelių koncentracijos, hipotezė buvo grindžiama DTL-C koncentracijos matavimais pagrįstais duomenimis, dėl to dauguma vėliau atliktų epidemiologinių bei mokslinių tyrimų aterosklerozės bei širdies ir kraujagyslių ligų rizikai įvertinti kaip nepriklausoma šių ligų rizikos veiksnį naudojo DTL-C koncentraciją [26]. Vis daugiau dėmesio skiriant atvirkštinei cholesterolio pernašai buvo pastebėta, jog šis procesas ne visada yra susijęs su padidėjusia DTL-C koncentracija plazmoje [7, 8]. Farmakologinių tyrimų duomenimis, tiriant cholesterolio esterų pernašos baltymo (CEPB) slopiklių bei niacino poveikį, buvo padidinta DTL-C koncentracija, tačiau širdies ir kraujagyslių ligų rizika nesumažėjo [9–11]. Tokie rezultatai privertė pergaltoti DTL hipotezės tinkamumą ir tyrinėti ne DTL dalelių kiekio, bet funkcijos įtaką aterosklerozės vystymuisi. Vienas iš funkcinio DTL rodiklių yra jau minėta cholesterolio išnašos geba. Rohatgi su kolegomis [27], tyrinėdami 2416 asmenų cholesterolio išnašos gebą, pastebėjo, jog ši geba pasižymėjo atvirkščia sąsaja su širdies ir kraujagyslių ligų klinikinių įvykių skaičiumi. Cholesterolio išnašos geba nepasižymėjo ir reikšminga koreliacija su DTL-C koncentracija (0,07; $P<0,05$) ar DTL dalelių koncentracija (0,15; $P<0,05$) [27]. Panašias išvadas atlikę tyrimus padarė Khera su kolegomis [7], pastebėję neigiamą sąsają tarp cholesterolio išnašos gebos bei širdies ir kraujagyslių ligų paplitimo, bei Saleheen su kolegomis [28], nustatę neigiamą sąsają tarp cholesterolio išnašos gebos ir mirtinų bei nemirtinų koronarinės širdies ligos priepuolių [7, 28]. Llera-Moya su kolegomis [29], ištyrę 263 asmenų kraujo serumą, nustatė, jog kraujo serumo mėginiuose su panašiomis DTL-C koncentracijomis cholesterolio išnašos geba statistiškai reikšmingai skyrėsi ($P<0,05$) [29]. Remiantis paskutinių dviejų dešimtmečių tyrimų rezultatais galima daryti prielaidą, jog cholesterolio išnašos geba yra nepriklausomas kraujagyslių bei širdies ligų rizikos žymuo, kuris suteikia papildomos indivi-

dualios informacijos apie paciento polinkį sirgti šiomis ligomis. Šiandien širdies ir kraujagyslių ligų rizikai įvertinti dažniausiai tiriama lipidų apykaitos rodikliai: triacilglicerolių (TAG), bendrojo cholesterolio (B-C), DTL-C bei MTL-C koncentracijos. MTL-C koncentracija dažniausiai apskaičiuojama pagal Friedewaldo formulę, remiantis B-C, DTL-C ir TAG koncentracijų vertėmis, rečiau ji nustatoma tiesiogiai. Kadangi su laukiama vis daugiau mokslinių tyrimų duomenų, kuriais remiantis DTL-C ne visada yra tinkamiausias dydis širdies ir kraujagyslių ligų rizikai įvertinti, cholesterolio išnašos gebos vertinimo metodų standartizavimas, pritaikymas klinikinei praktikai bei įtraukimas į rizikos vertinimo algoritmus gali suteikti papildomos in-

formacijos vertinant riziką susirgti šiomis ligomis [7, 8, 13, 28, 29].

IŠVADOS

Praėjus daugiau nei 40 metų po DTL-C hipotezės paskelbimo, naujų mokslinių tyrimų surinkti duomenys leidžia daryti prielaidą, jog įprastai matuojama DTL-C koncentracija nėra tinkamiausias žymuo aterosklerozės bei širdies ir kraujagyslių ligų rizikai vertinti. Gilinantis į atvirkštinės cholesterolio pernašos procesą daugiau dėmesio skiriama ne kiekybiniais, bet kokybiniais DTL parametrams. Vienas iš pagrindinių DTL funkcijos vertinimo rodiklių – cholesterolio išnašos geba, pasižyminti dideliu potencialu tapti papildomu širdies ir krau-

jagyslių ligų rizikos vertinimo žymeniu, kuris suteiktų informacijos apie individo cholesterolio homeostazę. Dabartiniai cholesterolio išnašos gebos vertinimo metodai pasižymi dideliu cholesterolio donorų, cholesterolio žymių bei cholesterolio akceptorų variabilumu, nėra standartizuoti ir dažniau taikomi moksliniais tikslais, tačiau svarbu toliau juos tobulinti siekiant sukurti metodą, kuris galėtų būti naudojamas kasdieniame klinikinių laboratorijų darbe. Standartizuoti metodai leistų atlikti didesnius populiacinius tyrimus ir įvertinti tikrąją cholesterolio išnašos gebos pridėtinę vertę nustatant individualią aterosklerozės bei širdies ir kraujagyslių ligų riziką. ♦

Gauta: 2019 11 15
Priimta spaudai 2019 12 27

Summary

CHOLESTEROL EFFLUX CAPACITY AND ITS LABORATORY MEASUREMENT METHODS: A REVIEW

Linas Černiauskas, Dovilė Karčiauskaitė

Reverse cholesterol transport has become an important subject in scientific studies since 1975, when the high-density lipoprotein (HDL) hypothesis was introduced. The hypothesis stated that the reduction of plasma HDL concentration may increase the development of atherosclerosis and ischaemic heart disease by disrupting cholesterol removal from the arterial wall. At that time, the lack of methodologies for determining HDL concentration lead to supporting the HDL hypothesis by research data based on high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) concentration measurements. This resulted in HDL-C concentration, instead of HDL concentration, becoming

a biomarker for assessing the risk of atherosclerotic and cardiovascular disease. The data collected from scientific research during the last two decades resulted in rising doubts whether the HDL-C concentration is the most appropriate biomarker for assessing atherosclerotic and cardiovascular disease risk. The scientific research of HDL functions was set in motion in order to find out what had caused this phenomenon. Studies on HDL-mediated cholesterol efflux from peripheral tissues lead to a quantitative measurement of this process and to the naming of this quantitative measurement as the cholesterol efflux capacity. Further research on cholesterol efflux capacity allowed to make the assumption

that it may be an independent atherosclerotic and cardiovascular disease biomarker that offers additional information on cholesterol homeostasis. Cholesterol efflux capacity measurement methods have more recently been in development; however, the standardization and result variability between methods still pose a challenge because of the different components used in these methods. Methodological improvements are very important in order to create a cholesterol efflux capacity measurement technique that could be routinely used in clinical laboratories, thus allowing bigger-scale population studies. These larger studies would allow assessing the real potential of the cholesterol efflux capacity in becoming an individual biomarker in the risk assessment of atherosclerotic and cardiovascular disease.

Keywords: cholesterol, reverse cholesterol transport, cholesterol efflux capacity, HDL functional research, atherosclerosis, cardiovascular disease.

LITERATŪRA

- Ramasamy I. Recent advances in physiological lipoprotein metabolism. *Clin Chem Lab Med (CCLM)* 2014; 52(12): 1695–727.
- Moore K, Sheedy F, Fisher E. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nat Rev Immunol* 2013; 13(10): 709–21.
- Talbot C, Plat J, Ritsch A, Mensink R. Determinants of cholesterol efflux capacity in humans. *Progress in Lipid Research* 2018; 69: 21–32.
- Hafiane A, Genest J. High density lipoproteins: measurement techniques and potential biomarkers of cardiovascular risk. *BBA Clinical* 2015; 3: 175–88.
- Horiuchi Y, Lai S, Yamazaki A, Nakamura A, Ohkawa R, Yano K, et al. Validation and application of a novel cholesterol efflux assay using immobilized liposomes as a substitute for cultured cells. *Bioscience Reports* 2018; 38(2). pii: BSR20180144.
- Song W, Wang W, Wang Y, Dou L, Chen L, Yan X. Characterization of fluorescent NBD-cholesterol efflux in THP-1-derived macrophages. *Molec Med Rep* 2015; 12(4): 5989–96.
- Khera A, Cuchel M, de la Llera-Moya M, Rodrigues A, Burke M, Jafri K, et al. Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis. *N Engl J Med* 2011; 364(2): 127–35.
- Rader D, Tall A. Is it time to revise the HDL cholesterol hypothesis? *Nat Med* 2012; 18(9): 1344–46.
- Landray MJ, Haynes R, Hopewell JC, Parish S, Aung T, Tomson J, et al. Effects of extended-release niacin with laropiprant in high-risk patients. *N Engl J Med* 2014; 371(3): 203–12.
- Boden WE, Probstfield JL, Anderson T, Chaitman BR, Desvignes-Nickens P, Koprowicz K, et al. Niacin in patients with low HDL cholesterol levels receiving intensive statin therapy. *N Engl J Med* 2011; 365(24): 2255–67.
- Barter P, Caulfield M, Eriksson M, Grundy S, Kastelein J, Komajda M, et al. Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N Engl J Med* 2007; 357(21): 2109–22.
- Tall A. Cholesterol efflux pathways and other potential mechanisms involved in the athero-protective effect of high density lipoproteins. *J Int Med* 2008; 263(3): 256–73.
- Anastasius M, Kockx M, Jessup W, Sullivan D, Rye K, Kritharides L. Cholesterol efflux capacity: an introduction

- for clinicians. *Am Heart J* 2016; 180: 54–63.
14. Yvan-Charvet L, Matsuura F, Wang N, Bamberger M, Nguyen T, Rinninger F, et al. Inhibition of cholesteryl ester transfer protein by torcetrapib modestly increases macrophage cholesterol efflux to HDL. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 2007; 27(5): 1132–38.
15. Phillips M. Molecular mechanisms of cellular cholesterol efflux. *J Biolog Chem* 2014; 289(35): 24020–29.
16. Tulenko T, Sumner A. The physiology of lipoproteins. *J Nucl Cardiol* 2002; 9(6): 638–49.
17. Rosenson R, Brewer H, Davidson W, Fayad Z, Fuster V, Goldstein J, et al. Cholesterol efflux and atheroprotection. *Circulation* 2012; 125(15): 1905–19.
18. Khera A, Rader D. Cholesterol efflux capacity. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 2013; 33(7): 1449–51.
19. Wang M, Guo H, Wang S, Yang R, Li H, Zhao H, et al. The measurement of high-density lipoprotein mediated cholesterol efflux from macrophage cells by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Cell Physiol Bioch* 2014; 34(6): 1901–11.
20. Sankaranarayanan S, Kellner-Weibel G, de la Llera-Moya M, Phillips M, Asztalos B, Bittman R, et al. A sensitive assay for ABCA1-mediated cholesterol efflux using BODIPY-cholesterol. *J Lipid Res* 2011; 52(12): 2332–40.
21. Solanko KA, Modzel M, Solanko LM, Wüstner D. Fluorescent sterols and cholesteryl esters as probes for intracellular cholesterol transport. *Lipid Insights* 2016; 8(Suppl 1): 95–114.
22. Litvinov DY, Savushkin EV, Garaeva EA, Dergunov AD. Cholesterol efflux and reverse cholesterol transport: experimental approaches. *Curr Medic Chem* 2016; 23(34): 3883–908.
23. Davidson W, Heink A, Sexmith H, Melchior J, Gordon S, Kuklenyik Z, et al. The effects of apolipoprotein B depletion on HDL subspecies composition and function. *J Lipid Res* 2016; 57(4): 674–86.
24. Rached F, Chapman M, Kontush A. HDL particle subpopulations: focus on biological function. *BioFactors* 2015; 41(2): 67–77.
25. Miller G, Miller N. Plasma-high-density-lipoprotein concentration and development of ischaemic heart-disease. *Lancet* 1975; 305(7897): 16–9.
26. Kingwell B, Chapman M, Kontush A, Miller N. HDL-targeted therapies: progress, failures and future. *Nat Rev Drug Discov* 2014; 13(6): 445–64.
27. Rohatgi A, Khera A, Berry J, Givens E, Ayers C, Wedin K, et al. HDL cholesterol efflux capacity and incident cardiovascular events. *N Engl J Med* 2014; 371(25): 2383–93.
28. Saleheen D, Scott R, Javad S, Zhao W, Rodrigues A, Picataggi A, et al. Association of HDL cholesterol efflux capacity with incident coronary heart disease events: a prospective case-control study. *The Lancet Diabetes & Endocrinol* 2015; (7): 507–13.
29. de la Llera-Moya M, Drazul-Schrader D, Asztalos B, Cuchel M, Rader D, Rothblat G. The ability to promote efflux via ABCA1 determines the capacity of serum specimens with similar high-density lipoprotein cholesterol to remove cholesterol from macrophages. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 2010; 30(4): 796–801.