

Přímé měření reverzního transportu cholesterolu

Poledne R., Králová-Lesná I.

Institut klinické a experimentální medicíny, Centrum výzkumu chorob srdce a cév, Praha

SOUHRN

Cíl studie: Zavést metodu měření reverzního transportu cholesterolu (RTC) a stanovit jeho hodnoty v populaci.

Metoda: Měření effluxu radioaktivního cholesterolu z předem označených makrofágů ¹⁴C cholesterolem ve tkáňové kultuře. Porovnat tyto hodnoty s lipoproteinovými parametry.

Výsledky: Průměrná hodnota RTC byla $12,51 \pm 2,74$ % radioaktivity přenesené na sérum testovaných osob. V celém souboru hodnoty RTC nekorelovaly s koncentrací celkového cholesterolu, ale významně pozitivně korelovaly s koncentrací HDL cholesterolu a zejména s koncentrací apoproteinu A1 ($p < 0,01$). Hodnota RTC navíc klesá s nadváhou a obezitou.

Závěr: Přímé stanovení RTC zpřesňuje odhad individuálního rizika klinických komplikací aterosklerózy v porovnání s koncentrací HDL cholesterolu a má význam zejména pro výzkum.

Klíčová slova: HDL cholesterol, apoprotein A1, reverzní transport cholesterolu.

SUMMARY

Poledne R., Králová-Lesná I.: Direct measurement of reverse cholesterol transport

Objective: To introduce a direct method of reverse cholesterol transport (RCT) measurement and to determine RCT data in population.

Material and methods: Measurement of radio-labeled cholesterol efflux from pre-labeled macrophages in tissue culture. Comparison of RCT data to lipoprotein parameters is outlined.

Results: The mean of RCT was 12.51 ± 2.74 % of radioactivity transferred from macrophages to serum of tested individuals. In the whole set of tested individuals RCT values were not related to total cholesterol concentration but significant positive correlation was documented to HDL cholesterol and namely to apoprotein A1 concentration ($p < 0.01$). RCT decreases with overweight and obesity.

Conclusion: Direct RCT measurement improves an estimation of risk of atherosclerosis clinical complications in comparison to HDL cholesterol concentration and it is an adequate tool for research.

Key words: HDL cholesterol, apoprotein A1, reverse cholesterol transport.

Úvod

Vyšší koncentrace HDL cholesterolu má protektivní vliv na rozvoj aterogenního procesu a klinických komplikací této patologie [3]. Přitom je doloženo, že protektivní vliv HDL částic je mnohočetný a ovlivňuje vedle vlastní kumulace cholesterolu v arteriální stěně i endoteliální funkci, působí nejen antioxidačně na LDL částice, ale má také výraznou funkci protizánětlivou [7] a antitrombotickou [8]. Nicméně, nejdůležitější funkcí je přímý vliv na transport cholesterolu. Lipoproteinové částice HDL hrají klíčovou roli v tzv. reverzním transportu cholesterolu (RTC) ze všech extrahepatálních buněk a klíčový význam má právě reverzní transport z buněk arteriální stěny [5].

Rodina HDL částic je ale velmi heterogenní, a to od malých částic jen nepatrně lipidovaného apoproteinu A1 (diskoidní částice) až po velké, kulovité partikule HDL3. Podle elektroforetické pohyblivosti se dělí na částice HDL2 a, b, c a HDL3a, b, c. Prvním a také nejdůležitějším krokem v reverzním transportu cholesterolu je odnětí nadbytečných molekul volného cholesterolu z celulární membrány. Tento krok pochopitelně předpokládá hydrolýzu depotních esterů cholesterolu v cytozolu buňky a transport volného cholesterolu k celulární membráně. Vedle volné difuze těchto cholesterolových molekul z buňky je podstatná část transportována prostřednictvím specifických receptorů ABCA1 a ABCG1 na malé diskoidní částice HDL, respektive největší

částice HDL3b [4, 10]. V intravazálním prostoru je volný cholesterol na těchto HDL partikulách nejdříve esterifikován pomocí lecitin-cholesterol-acyltransferázy (LCAT) a dále vyměňován prostřednictvím cholesterol-ester-transferproteinu (CETP) za triglyceridy na částicích VLDL. Odstranění cholesterolu z intravazálního prostoru do jater pak probíhá buď vychytáním remnantních VLDL (zmenšených částečně lipolýzou), nebo přímo vychytáváním částic HDL ve specifickém receptoru SR-B1 na povrchu hepatocytu.

V rámci tohoto složitého metabolického děje je nejdůležitějším krokem přenos nadbytečného cholesterolu z celulární membrány (při transportu z arteriální stěny, tedy z povrchu makrofágů či buněk hladkého svaly) na částice HDL. Pouze některé subfrakce HDL mají tuto schopnost, proto je zřejmé, že běžně dostupné stanovení celkového HDL cholesterolu v laboratořích klinické biochemie neodpovídá přímo skutečnému transportu cholesterolu z extrahepatálních buněk do jater. Pochopitelná je proto snaha měřit RTC přímou metodou. Stanovení aktivity následných kroků LCAT a CETP nemá žádný další přínos k odhadu individuálního rizika aterosklerózy, a proto se v posledních letech soustředilo úsilí řady laboratoří na měření rychlosti prvního a nejdůležitějšího kroku RTC – měření effluxu cholesterolu z celulární membrány. Vhodnou metodou je sledování effluxu značeného cholesterolu s radioaktivně označenými buňkami ve tkáňové kultuře na

vhodný akceptor. Tento efflux se vyjadřuje procentem značeného cholesterolu přeneseného na akceptor z označených buněk.

Materiál a metody

Stanovení lipoproteinů

Celkový cholesterol byl stanoven enzymatickou metodou (Roche Diagnostica, Švýcarsko) a hodnoty HDL cholesterolu po separaci lipoproteinů obsahujících apoprotein B kyselinou fosfowolframovou s použitím autoanalyzátoru Hitachi 920. Koncentrace apoproteinu A1 byla stanovena imunoturbidimetrickou metodou (Orion Diagnostics, Espoo, Finsko).

In vitro měření effluxu

Z několika v literatuře popsanych použitých buněk ve tkáňové kultuře jsme se rozhodli užít lidské makrofágy, neboť se nejvíce přibližují situaci transportu cholesterolu *in vivo* z arteriální stěny. Lidské monocyty linie THP1 byly osazeny do inkubačních misek v hustotě 2×10^5 buněk/ml a inkubací za přítomnosti forbol 12-myristát acetátu (100 ng/ml) po dobu 72 hodin byly maturovány na makrofágy. Makrofágy byly následně inkubovány 48 hodin v RPMI médiu, do kterého byl přidán ^{14}C cholesterol. Značený cholesterol byl do objemu inkubačního média přidán v malém objemu etanolu při třepání. Následně byly označené buňky omyty v PBS obsahujícím 0,1% albumin prostý mastných kyselin. Vlastní měření effluxu značeného cholesterolu do média obsahujícího 5% testovaného séra probíhalo po dobu 240 minut. Z obrázku 1 je patrné, že počáteční rychlost značených molekul z povrchu buněk je zásadně rychlejší než rovnovážná rychlost effluxu značeného cholesterolu intracelulárně. Byly odebrány vzorky média v časech 0-15-240 minut

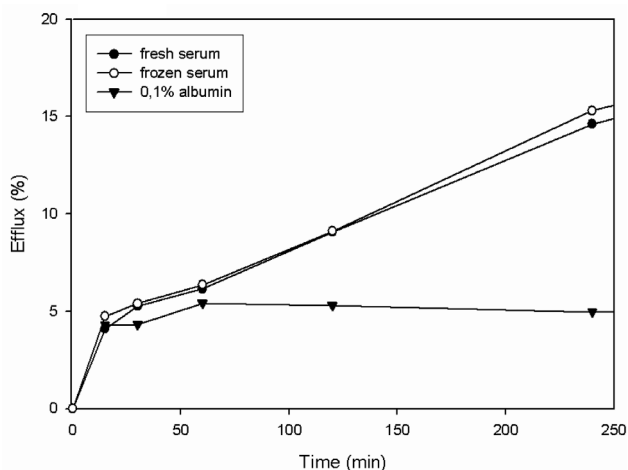


Fig. 1. Dynamic of labeled cholesterol efflux from ^{14}C cholesterol pre-labeled macrophages to 5% human serum during incubation and comparison to control medium, 0.1% bovine albumin without fatty acids

Identical 1st part of the curve represents a simple wash-out of labeled cholesterol from cell surface. RCT was measured between 15th and 240th minutes. No difference was found between efflux rate using fresh or once frozen and defrozen serum.

a výsledná hodnota effluxu cholesterolu byla stanovena z effluxu mezi 15. a 240. minutou. Tato hodnota byla vyjádřena jako procento radioaktivity uvolněné do média z celkové radioaktivity v systému (součet radioaktivity v buňkách a médiu). Po odstranění zbytků buněk centrifugací byla alikvotní část média přímo přidána do 8 ml scintilační tekutiny (Rotiszint 11, ROTH, Německo) ke stanovení radioaktivity metodou scintilační spektrometrie (liquid scintillation analyzer, Tri-Carb 2900TR, PerkinElmer). Makrofágy po dvojnásobném opláchnutí chlazeným PBS byly zmrazeny po dobu 1 hodiny a po rozmrazení byly lipidy extrahovány směsí izopropanolu s hexanem (v poměru 2 : 3). Po odstranění zbytků buněk centrifugací byla alikvotní část extrakční směsi odpařena ve scintilační nádobce a byla k ní přidána scintilační tekutina. Výsledné hodnoty effluxu byly průměrnou hodnotou triplicátu měření, pouze u osmi vzorků (tj. 7,68 %) byla pro hodnocení využita metoda odmítnutí nejodlehlejší hodnoty a výsledná hodnota byla průměrem duplikátu zbylých dvou hodnot. Ke stanovení effluxu bylo použito vždy čerstvé rozmražené sérum, neboť naše předchozí experimenty prokázaly, že jednorázové zmrazení a rozmrazení nemá vliv na hodnotu měřeného effluxu (viz obr. 1). Opakovatelnost metody měření effluxu cholesterolu vyjádřená variačním koeficientem je 9,95 %. Absolutní rozdíly v triplicátech byly $\pm 1,2\%$ (SD 0,52).

Vyšetřené osoby

RTC byl testován u 96 zdravých mladých dobrovolníků. Krevní vzorek byl odebrán ráno po 12 hodinách lačnění, vzorek na stanovení lipoproteinů byl přímo centrifugován v chlazené centrifuze, sérum staženo, rozděleno na alikvotní části a uchováváno v $-80\text{ }^\circ\text{C}$ až do analýzy. Vzorek na stanovení effluxu cholesterolu byl nejdříve zchlazen ve vodní lázni s ledem a poté zpracováván podobně. Analýza lipoproteinů a měření effluxu probíhalo etapově po skupinách 20 pacientů. Dobrovolníci podepsali Informovaný souhlas před začátkem pokusu. Pokus byl schválen Etickou komisí IKEM a FTN.

Výsledky a diskuse

Hodnoty effluxu značeného cholesterolu byly stanoveny u 96 mladých dobrovolníků (poměr žen a mužů 2 : 1) k získání normálních hodnot RTC v populaci. Stanovení RTC v reprezentativním populačním vzorku nemohlo být realizováno, neboť akceptor –sérum testované osoby – musí být bezprostředně po odběru chlazen v ledové lázni. To nelze v rozsáhlé epidemiologické studii jednoduše realizovat, proto byly získány hodnoty na dobrovolnících. Porovnali jsme hodnoty lipoproteinů našeho souboru dobrovolníků s reprezentativním 1% populačním vzorkem (pokračování projektu WHO MONICA v letech 2007–2008 v 6 okresech České republiky). Z tohoto vzorku byla vybrána skupina srovnatelná věkem a podílem mužů a žen.

Z tabulky 1 je zřejmé, že se skupina dobrovolníků nelišila od populačního vzorku jak v hodnotě celkového cholesterolu, tak v hodnotě HDL cholesterolu. Tato

skupina měla nicméně mírně vyšší hodnotu body mass indexu (BMI) v porovnání se vzorkem české populace srovnatelné věkem a pohlavím. Průměrná hodnota effluxu cholesterolu byla 12,51 % (SD 2,74) s minimální hodnotou 7,12 a maximální 19,21 %.

Data byla testována na shodu s normálním rozložením (Shapiro-Wilk's test, $p = 0,19$). Nejistili jsme žádný vztah hodnot effluxu cholesterolu s koncentrací celkového cholesterolu. Na rozdíl od výsledků Berrougui et al. (2007), které prokázaly nižší hodnotu RTC u skupiny mladých a starých osob lišících se o 35 let, jsme v našem souboru vliv věku neprokázali, neboť v našem souboru hodnota RTC s věkem nekorelovala.

Jak je ale zřejmé z obrázku 2, prokázali jsme mírnou korelaci hodnot effluxu s hodnotami HDL cholesterolu a korelaci na vyšším stupni s koncentrací apoproteinu A1. Ve shodě s recentně publikovanými závěry Catalana et al. [2] koncentrace HDL cholesterolu nemusí být

Table 1. Comparison of data of group of volunteers with a representative Czech population sample

	Total cholesterol [mmol/l]	HDL cholesterol [mmol/l]	BMI [v kg/m ²]
Volunteers (n = 97)	4.72 ± 0.81	1.42 ± 0.36	27.3 ± 4.0
Czech population sample (n = 194)	4.71 ± 0.82	1.40 ± 0.42	25.6 ± 4.6

absolutním indikátorem RTC. Hodnoty effluxu naopak klesaly s rostoucím BMI, tedy s rostoucím množstvím tělesného tuku. To je logické vzhledem k opakovaně prokázanému negativnímu vlivu nadváhy a obezity na koncentraci protektivních částic HDL [3].

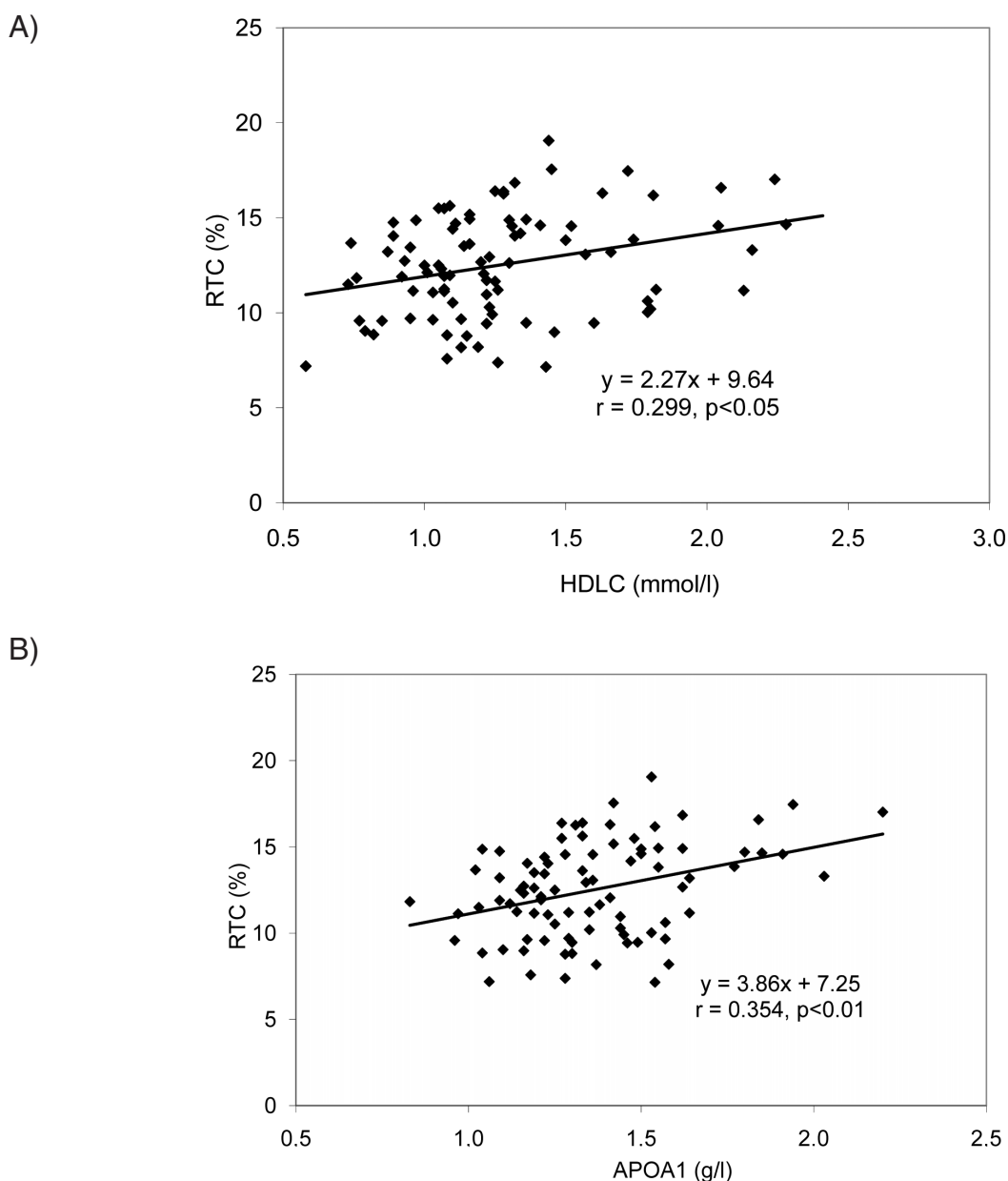


Fig. 2. Correlations of reverse cholesterol transport data from pre-labeled macrophages to 5% serum of 96 tested volunteers A – correlation to HDL cholesterol (mmol/l), B – correlation to concentration of apoprotein A1 (g/l), C – correlation to BMI (kg/m²).

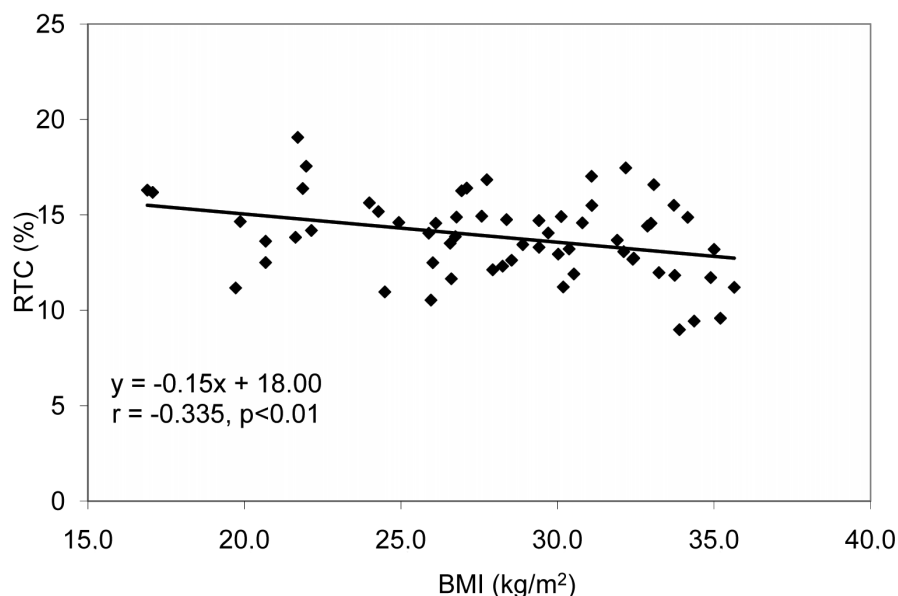


Fig. 2. Correlations of reverse cholesterol transport data from pre-labeled macrophages to 5% serum of 96 tested volunteers A – correlation to HDL cholesterol (mmol/l), B – correlation to concentration of apoprotein A1 (g/l), C – correlation to BMI (kg/m²).

Závěr

Přímé měření RTC stanovením effluxu cholesterolu z označených makrofágů do média obsahujícího sérum testovaných osob je vhodnou metodou pro odhad významu této metabolické cesty v ovlivnění aterosenního procesu u testovaných jedinců. Hodnoty effluxu nejlépe korelovaly s koncentrací apoproteinu A1, což je v souladu s literárními údaji označujícími mírně lipidovaný apoprotein A1 jako hlavní akceptor celulórního cholesterolu. Provedení této metody je časově náročné a umožňuje získat přímou informaci o důležitém metabolickém kroku a vlivu části HDL partikulí. Je vhodnou metodou pro výzkum stanovení změn individuálního rizika vlivem vnějších faktorů [6] nebo naopak genetickou determinaci [9].

Metoda se pravděpodobně neuplatní v běžné laboratorní praxi pro odhad individuálního rizika kardiovaskulárních nemocí.

Literatura

1. **Berrougui, H., Cloutier, M., Isabelle, M. et al.** Phenolic-extract from argan oil (*Argania spinosa L.*) inhibits human low-density lipoprotein (LDL) oxidation and enhances cholesterol efflux from human THP-1 macrophages. *Atherosclerosis*, 2006, 184, p. 389–396.
2. **Catalano, G., Duchene, E., Julia, Z. et al.** Cellular SR-BI and ABCA1-mediated cholesterol efflux are gender-specific in healthy subjects. *J. Lipid Res.*, 2008, 49, p. 635–643.
3. **Franceschini, G.** Epidemiologic evidence for high-density lipoprotein cholesterol as a risk factor for coronary artery disease. *Am. J. Cardiol.*, 2001, 88, p. 9N–13N.
4. **Jessup, W., Gelissen, I. C., Gaus, K., Kritharides, L.** Roles of ATP binding cassette transporters A1 and G1, scavenger receptor BI and membrane lipid domains in cholesterol export from macrophages. *Curr. Opin. Lipidol.*, 2006, 17, p. 247–257.
5. **Králová-Lesná, I., Kovář, J., Poledne, R.** Reverse cholesterol transport. *CorVasa* 2006, 48, s. 114–120.
6. **Králová-Lesná, I., Suchánek, P., Kovář, J., Stávek, P., Poledne, R.** Replacement of dietary saturated fatty acids by polyunsaturated fatty acids in diet and reverse cholesterol transport. *J. Lipid Res.*, 2008, 49, p. 2414–2417.
7. **Murphy, J. A., Woollard, K. J., Hoang, A. et al.** High-density lipoprotein reduces the human monocyte inflammatory response. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2008, 28, p. 2071–2077.
8. **von. Ekardstein, A., Hersberger, M., Rohrer, L.** Current understanding of the metabolism and biological actions of HDL. *Curr. Opin. Clin Nutr. Metab. Care*, 2005, 8, p. 147–152.
9. **Soro-Paavonen, A., Naukkarinen, J., Lee-Rueckert, M. et al.** Common ABCA1 variants, HDL levels, and cellular cholesterol efflux in subjects with familial low HDL. *J. Lipid Res.*, 2007, 48, p. 1409–1416.
10. **Wang, N., Lan, D., Chen, W.** ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, 101, p. 9774–9779.

Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR č. NR/8486-4.

Do redakce došlo 22. 1. 2009.

Adresa pro korespondenci
Prof. ing. Rudolf Poledne, CSc.
Institut klinické a experimentální medicíny
Centrum výzkumu chorob srdce a cév
Václavská 1958/9
140 21 Praha 4
e-mail: rudolf.poledne@ikem.cz