

VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETO
BIOMEDICINOS MOKSLŲ INSTITUTO
FIZIOLOGIJOS, BIOCHEMIJOS, MIKROBIOLOGIJOS IR
LABORATORINĖS MEDICINOS KATEDRA

MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS

**DIDELIO TANKIO LIPOPROTEINŲ CHOLESTEROLIO IŠNEŠIMO
GEBA DIDELĖS KARDIOVASKULINĖS RIZIKOS PACIENTAMS**

Magistrantė RŪTA AMŠIEJŪTĖ – KIRLIENĖ _____
(parašas)

Darbo vadovas
doc., dr. D. Karčiauskaitė _____
(parašas)

VU MF Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir
Laboratorinės medicinos katedros vedėja
doc., dr. D. Karčiauskaitė leidžiama ginti _____
(parašas)

Darbo įteikimo data _____

Registracijos Nr. _____

2018 m., Vilnius

TURINYS

SANTRUMPOS	4
ĮVADAS	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA	6
1.1. Aterosklerozė	6
1.2. Aterosklerozės patogenezė.....	6
1.3. Didelio tankio lipoproteinai ir aterosklerozė.....	8
1.3.1. Didelio tankio lipoproteinai (DTL)	8
1.3.2. Didelio tankio lipoproteinų funkcijos.....	10
1.3.3. Didelio tankio lipoproteinų apolipoproteinai	10
1.3.4. Didelio tankio lipoproteinų apykaita	12
1.4. Cholesterolio išnešimo geba.....	14
2. TYRIMO METODAI IR APIMTIS.....	16
2.1. Tiriamoji grupė.....	16
2.2. Tyrimo metodai	16
2.2.1. Lipidų apykaitos rodiklių nustatymas	16
2.2.2. Apolipoproteinų nustatymas	18
2.2.3. Įrenginiai ir priemonės.....	19
2.2.4. Reagentai.....	19
2.2.5. Ląstelių kultivavimas	20
2.2.6. Cholesterolio išnešimo geba	21
2.3. Statistinė analizė.....	22
3. TYRIMO REZULTATAI.....	23
3.1. Bendras cholesterolis įskaitant lipidų apykaitos rodiklius	23
3.2. DTL cholesterolio išnešimo geba.....	24
3.3. Cholesterolio išnešimo gebos ir lipidų apykaitos rodiklių ryšys.....	25
3.4. Cholesterolio išnešimo geba tarp sveikų ir sergančių dislipidemija pacientų.....	25
3.5. Cholesterolio išnešimo gebos ir lipidų apykaitos rodiklių ryšys tarp sveikų ir sergančių dislipidemija pacientų.....	27
3.6. Cholesterolio išnešimo gebos palyginimas tarp moterų ir vyrų	29
3.6.1. Cholesterolio išnešimo geba tarp sveikų moterų ir vyrų.....	31
3.6.2. Cholesterolio išnešimo geba tarp dislipidemija sergančių moterų ir vyrų	34
3.7. Cholesterolio išnešimo geba ir amžius.....	36
REZULTATŲ APTARIMAS.....	40
IŠVADOS.....	43

SUMMARY.....	44
LITERATŪROS SARAŠAS.....	47

SANTRUMPOS

- ABCA1** – nuo ATP priklausomas pernešėjas A1
ABCG1 – nuo ATP priklausomas pernešėjas G1
Apo – apolipoproteinas
ATP – adenzintrifosfatas
B – Ch – bendras cholesterolis
CE – cholesterolio esteris
CETP – cholesterolio esterius pernešantis baltymas
Ch – cholesterolis
CO₂ – anglies dioksidas
DTL – Ch – didelio tankio lipoproteinų cholesterolis
DTL – didelio tankio lipoproteinai
INF – γ – interferonas gama
LCAT – lecitincholesterolaciltransferazė
LMTL – labai mažo tankio lipoproteinai
LPL – lipoproteinlipazė
MCP1 – monocitų chemoatraktantinis baltymas
miRNR – mikro RNR
MTL – Ch - mažo tankio lipoproteinų cholesterolis
MTL – mažo tankio lipoproteinai
PGI₂ – prostaciklinas
PLTP – fosfolipidus pernešantis baltymas
SR – B1 – B klasės I tipo receptoriai – surinkėjai (*scavenger* – receptoriai)
ŠKL – širdies ir kraujagyslių ligos
TAG – triacilgliceroliai
TTL – tarpinio tankio lipoproteinai
VCAM – 1 – kraujagyslių ląstelių sukibimo molekulė

ĮVADAS

Širdies ir kraujagyslių ligos yra pagrindinė mirties priežastis pasaulyje. Dažniausiai arterijas pažeidžia aterosklerozė. Tai liga, kuri generalizuotai pakenkia arterijas [43]. Aterosklerozė pasireiškia išsivysčiusiose šalyse, ne išimtis ir Lietuva. 2014 metais Lietuvoje nuo širdies ir kraujagyslių ligų mirė apie 3,5 tūkstančius, Europoje – apie 1,8 milijonus žmonių [20].

Epidemiologai remiantis statistiškai patikimais duomenimis nustatė, kad esant mažesnei didelio tankio lipoproteinų cholesterolio (DTL – Ch) koncentracijai yra didesnė rizika sirgti širdies ir kraujagyslių ligomis (ŠKL) ir atvirkščiai, jei DTL – Ch koncentracija didesnė tiems pacientams yra mažesnė rizika sirgti ŠKL [35]. Didelio tankio lipoproteinai perneša cholesterolį iš periferijos į kepenis iš kurių su tulžimi per virškinamąjį traktą cholesterolis pašalinamas iš organizmo. Šis kelias vadinamas grįžtamuju cholesterolio transportu [41]. Grįžtamasis cholesterolio transportas yra pagrindinė DTL atliekama funkcija, o svarbiausias žingsnis šiame kelyje yra cholesterolio pernešimas iš makrofagų į DTL. Cholesterolio kaupimasis makrofaguose skatina putotųjų ląstelių susidarymą, o šios yra pradinis veiksnys aterosklerozinės plokštelės susidaryme. Taigi DTL – sąlyginai nedidelė dalelė (apie 8 – 10 nm) pasižymi itin svarbiomis antiaterogeninėmis savybėmis.

Naujausiuose tyrimuose įrodyta, kad ne DTL – Ch kiekis, o DTL atliekama funkcija turi ryšį su ateroskleroze [14]. Cholesterolio išnešimo geba tai žymuo, kuris ateityje padės tiksliau įvertinti riziką formuoti aterosklerozinei plokštelei ir taip pat bus naudojamas gydymo efektyvumui stebėti.

DARBO TIKSLAS: Įvertinti didelio tankio lipoproteinų cholesterolio išnešimo gebą sveikiems ir kardiovaskulinės rizikos pacientams.

Uždaviniai:

1. Išmatuoti didelio tankio lipoproteinų cholesterolio išnešimo gebą ir palyginti su kitais lipidų apykaitos rodikliais.
2. Palyginti didelio tankio lipoproteinų cholesterolio išnešimo gebą tarp sveikų ir dislipidemija sergančių pacientų.
3. Palyginti didelio tankio lipoproteinų cholesterolio išnešimo gebą tarp moterų ir vyrų.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Aterosklerozė

Aterosklerozė (gr. *atherosclerosis*) terminas kilęs iš graikų kalbos: *athere* – košelė, *sclero* – kietas [5]. Tai yra sudėtinga lėtinė uždegiminė liga, kuri pažeidžia didžiąsias arterijas. Kitaip dar vadinama arterijų liga, ši liga yra pagrindinė mirtingumo priežastis išsivysčiusiose šalyse [36].

Aterosklerozės vystymosi eigoje kraujagyslės praranda elastingumą, o tuo pačiu ir savo funkciją. Vystosi struktūriniai ir funkciniai pakitimai, formuojasi plokštelė (ateroma), siaurėja kraujagyslių spindis, vystosi audinių ir organų hipoksija, jungiamojo audinio išvešėjimas, galiausiai – nekrozė. Dažniausios aterosklerozės komplikacijos – krūtinės anginos priepolis, miokardo infarktas ir insultas, dažnai baigiasi mirtimi [51, 2].

Anksčiau buvo manoma, kad aterosklerozė yra pasyvus procesas ir būdingas tik vyresnio amžiaus žmonėms, tačiau ši liga vystosi nuo vaikystės [36]. Ateroskleroziniai pažeidimai siaurina kraujagyslių spindį ir dažnai sukelia mirtiną išemiją arba trombozę širdies, smegenų, kojų ir kt. arterijose. Vyrams iki 60 metų miokardo infarktas įvyksta dažniau nei to pačio amžiaus moterims, tačiau po 60 metų rizika tarp abiejų lyčių susivienodina [51].

1.2. Aterosklerozės patogenezė

Išskiriami penki pagrindiniai aterosklerozės vystymosi etapai: 1) endotelio funkcijos nepakankamumas, mažo tankio lipoproteinų (MTL) kaupimasis; 2) leukocitų ir lygiųjų raumenų ląstelių migracija; 3) putotųjų ląstelių susidarymas 4) riebalinio ruoželio formavimasis intimoje; 5) lipidinė dėmė. Šių etapų galutinis rezultatas aterosklerotinės plokštelės susidarymas [11, 36].

Arterijos sienelė sudaryta iš trijų sluoksnių: vidinio (*tunica intima*); vidurinio (*tunica media*); išorinio (*tunica adventicia*). Vidinis sluoksnis yra arčiausiai arterijos spindžio ir turintis kontaktą su krauju. Jis sudarytas iš vieno endotelio ląstelių sluoksnio ir bazinės membranos. Vidurinis sluoksnis sudarytas iš lygiųjų raumenų ląstelių, elastinių skaidulų ir jungiamojo audinio. Išorinis kraujagyslės sluoksnis sudarytas iš jungiamojo, riebalinio ir nervino audinių [24, 13].

Endotelio pažeidimas. Pagrindinė endotelio funkcija palaikyti kraujagyslių homeostazę. Endotelis yra pusiau pralaidus, jis kliūtis tam tikriems kraujyje cirkuliuojantiems elementams. Endotelis reguliuoja skysčių, maisto medžiagų, dujų apykaitą tarp kraujo ir

audinių, neleidžia kraujo ląstelės prilipti. Jo ląstelės reguliuoja kraujagyslių susitraukimą ir atsipalaidavimą. Endotelis sintetina kraujagysles plečiančias medžiagas (azoto oksidą ir prostacikliną) ir sutraukiančias medžiagas (endoteliną ir angiotenziną II) [43, 11].

Esant endotelio pažeidimams jis išskiria citokinus, baltymus, kurie turi specifinį poveikį ląstelių sąveikai. Jie sukelia ir palaiko uždegimą, skatindami makrofagus migruoti į pažeidimo vietą [11]. Taigi endotelis svarbus imuninio atsako reguliatorius. Endotelio ląstelės gali reaguoti į įvairius homeostazės pokyčius ir virsti „aktyviomis“ endotelio ląstelėmis [13].

Vieni iš svarbiausių aterosklerozės patogenezėje yra MTL. Ši dalelė neša didelį kiekį susintetinto cholesterolio iš kepenų į periferiją (į audinius). Šis lipoproteinas gali pereiti iš kraujo į intimą dėl jo gebėjimo pereiti per endotelio tarpus. Per endotelį taip pat gali patekti DTL, kiti lipoproteinai per endotelį migruoti negali dėl savo dydžio [24, 36]. Įvykus pažeidimui ir sutrikus pusiausvyrai, intimos sluosnyje kaupiasi MTL, vyksta šių lipoproteinų oksidacija. MTL prisijungę prie proteoglikano tampa jautrūs oksidacijai [5]. Pradedama formuotis ateroma, ji didėja ir siaurina kraujagyslės spindį. Jeigu aterosklerotinė plokštelė užima daugiau kaip 40 % vidinio sluoksnio spindžio – sutrinka kraujotaka ir audiniai neaprupinami deguonimi ir maisto medžiagomis [36].

Endotelio disfunkcija yra vienas pagrindinių priežastinių veiksnių aterogenezeje, skatinantis uždegimą ir ateromos formavimą. Endotelio pakitimus gali sukelti diabetas, hipertenzija, rūkymas, širdies nepakankamumas ir kt. [11].

Uždegimas. Aterosklerozei būdingas monocitų ir limfocitų telkimas į arterinę sienelę. Šių ląstelių migraciją skatina oksiduoti MTL, kurie stimuliuoja endotelines ląsteles. Aktyvuotos endotelio ląstelės sintetina uždegimo ir sukibimo molekules, augimo faktorius. Kraujagyslių ląstelių sukibimo molekulė 1 (VCAM – 1) įgalina endotelio ląsteles jungtis tik su tomis uždegimo ląstelėmis, kurios kaupiasi ankstyvoje aterosklerozinėje plokštelėje: monocitai ir T limfocitai. Monocitai į intimą patenka dėl monocitų chemoatraktantinio baltymo 1 (MCP – 1), T limfocitai į vidinį sluoksnį patenka dėl interferono gama (IFN – γ) chemoatraktantų [26].

Kai monocitai patenka į intimą jie virsta makrofagais. Monocitų vartimą makrofagais reguliuoja makrofagų kolonijas stimuliuojantis faktorius [5]. Šie mononukleariniai fagocitai – makrofagai per SR – B1 receptorių skatina oksiduotų lipoproteinų įsisavinimą, to pasekoje formuojasi putotosios ląstelės. Putotosios ląstelės prikaupusios cholesterolio nusėda intimos sluoksnyje [25, 26].

T limfocitai taip pat atlieka svarbų vaidmenį aterosklerozės patogenezėje. T limfocitai išskiria citokinus, skatinančius lygiųjų raumenų ląsteles migruoti į intimą. Lygiųjų raumenų ląstelės veikiamos augimo faktorių pradeda daugintis. To pasekoje intimoje pradeda kauptis

lygiųjų raumenų ląstelės, kurios gamina kolageną, elastines skaidulas ir proteoglikaną. Susidaro jungiamasis audinys, kuris apsupa susikaupusius lipidus ir tai suformuoja aterosklerozinės plokštelės fibrozinį dangtelį [26]. Uždegimas atlieka svarbų vaidmenį visuose aterosklerozės etapuose. Uždegiminė reakcija sukelia nuolatinį makrofagų ir limfocitų aktyvumą [48].

Putotųjų ląstelių susidarymas. Mononukleariniai fagocitai intimoje virsta makrofagais. Fagocitai gali užkirsti kelią aterosklerozei fagocituodami lipidus iš intimos. Jei endotelis nepažeistas, makrofagai sugeba pašalinti lipidus, tačiau jei lipidų koncentracija didėja greičiau negu, kad makrofagai fagocituoja ir pašalina iš intimos, visa tai sukelia lipidų kaupimąsi ir dėl to formuojasi ateroma. Makrofagai didelį kiekį oskiduotų MTL fagocituoja ir virsta putotosiomis ląstelėmis, kurios atsideda intimoje [36]. Putotosios ląstelės, kaip ir endotelis bei T limfocitai, išskiria citokinus, kurie skatina lygiųjų raumenų ląstelių proliferaciją [26, 13].

Fibrozinis dangtelis. Aterogenezės požymiai pastebimi gana anksti: susidaręs lipidinis ruoželis yra gelsvos spalvos ties arterijos intimos sluoksniu. Lipidinis ruoželis nemažina kraujagyslės spindžio ir netrukdo kraujui tekėti. Šie pokyčiai stebimi jauniems asmenims iki 20 m., kol jokių klinikinių simptomų dar nėra [36]. Jeigu lipidinis ruoželis vystosi staigiai, tikėtina, kad tai susiję su endotelio funkcijos nepakankamumu. Tokiu atveju vystosi uždegimas, skatinama leukocitų migracija ir putotųjų ląstelių susidarymas. Iš kolageno, lygiųjų raumenų, makrofagų ir T limfocitų susidaro fibrozinis dangtelis. Visi šie elementai sudaro aterosklerozinę plokštelę, kuri išsiplėčia į kraujagyslės kanalą, ir taip sumažina jo spindį [11].

Išplitę pažeidimai ir trombozė. Pažeidus aterosklerozinę plokštelę lipidai patenka į kraują ir prisideda prie trombocitų kaupimosi ir krešulio susidarymo, kuris gali pilnai uždaryti kraujagyslės spindį. Plyšimo metu atsivėrusius plokštelėje esančios medžiagos aktyvina trombocitus ir krešėjimo kaskadą ir taip gali sukelti trombozę [36, 26].

Apibendrinant galima teigti, kad aterosklerozė yra intimos pažeidimo padarinys, kurią sukelia įvairių ląstelių – monocitų, lygiųjų raumenų ląstelių, limfocitų reakcija, o pirminį pažeidimą sąlygoja perteklinis cholesterolio kiekis [36].

1.3. Didelio tankio lipoproteinai ir aterosklerozė

1.3.1. Didelio tankio lipoproteinai (DTL)

Lipoproteinai yra sferinės dalelės, kurių šerdinė dalis sudaryta iš laisvojo cholesterolio, cholesterolio esterių ir trigliceridų, išorėje ją gaubia fosfolipidų sluoksnis su įsiterpusiais

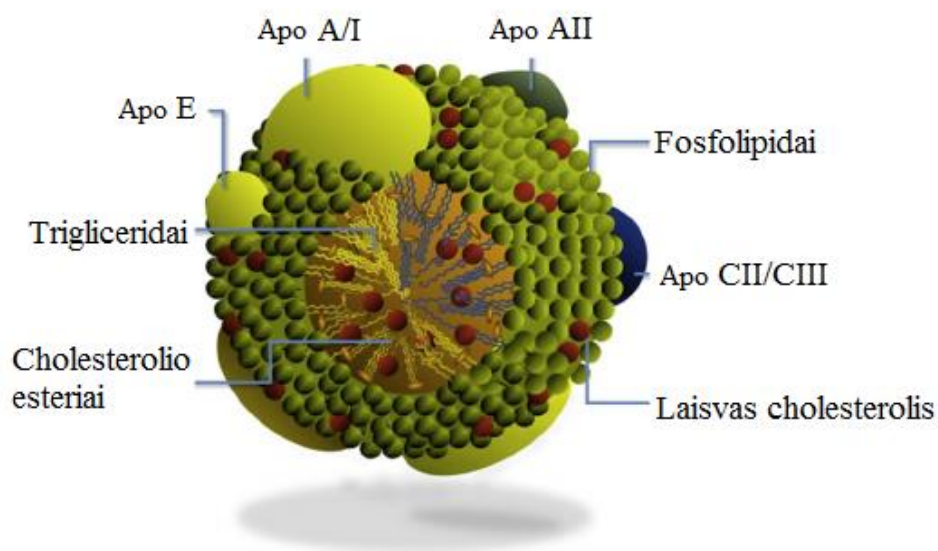
baltymais (1 pav.). Išorėje esantys baltymai vadinamai apolipoproteinais. Pagrindinė lipoproteinų funkcija yra pernešti lipidus kraujyje [18].

Kraujyje randami penkių tipų lipoproteinai: chilomikronai, labai mažo tankio lipoproteinai (pre – β lipoproteinai, LMTL), mažo tankio lipoproteinai (β lipoproteinai, MTL), didelio tankio lipoproteinai (α lipoproteinai, DTL) ir lipoproteinas a [24].

DTL pirmą kartą buvo aptikti 1950 metais, ultracentrifugavimo metodu. DTL yra mažiausias ir tankiausias serume esantis lipoproteinas. Jo dydis svyruoja nuo 7 iki 20 nm [8]. Žmogaus plazmoje didelio tankio lipoproteino dalelė yra nevienalytė. Tai lemia dalelės tankis, dydis, forma, paviršiaus krūvis ir struktūra. DTL sudaryti iš daugiau nei 80 skirtingų baltymų ir daugiau kaip 200 lipidų rūšių, jų sudėtyje taip pat yra miRNR ir kt. molekulių. [38, 30, 1].

DTL dalelę daugiausiai sudaro fosfolipidai 35 – 50%, pagrindinis fosfolipidas – fosfatidilcholinai. Sfingolipidai sudaro 5 – 10%. Laisvas cholesterolis ir kiti steroliai sudaro taip pat apie 5 – 10%, bet cholesterolio esteriai 30 – 40% lipidų masės. Struktūriškai svarbiausi yra apolipoproteinas (Apo) AI ir (Apo) AII (sudaro 70% ir 20% baltymų masės), sudarantys didžiąją DTL dalelės baltymo dalį [8].

Didelio tankio lipoproteinų koncentracija vyrų kraujo serume yra ($>0,91$ mmol/L), moterų ($>1,2$ mmol/L), moterų kraujyje DTL koncentracija yra didesnė nei vyrų. Šie lipoproteinai perneša apie ketvirtadalį kraujyje esančio cholesterolio [24].



1 pav. Didelio tankio lipoproteinų (DTL) struktūra [28].

1.3.2. Didelio tankio lipoproteinų funkcijos

Ryšys tarp aterosklerozės ir DTL – Ch yra sudėtingesnis nei tarp aterosklerozės ir MTL – Ch. Epidemiologiniai tyrimai teigia, kad maža DTL koncentracija yra susijusi su ateroskleroze. Mažas DTL kiekis yra susijęs su padidėjusia triacilglicerolių koncentracija. DTL taip pat yra svarbus užkertant kelią aterosklerozės vystymuisi per atvirkštinį cholesterolio transportą, šalinant cholesterolį iš periferijos ir grįžtant į kepenis, kur cholesterolis panaudojamas hormonų ar tulžies rūgščių sintezei, ir per žarnyną pašalinamas iš organizmo [26]. Dėl šios DTL atliekamos funkcijos arterijų sienelė yra apsaugoma nuo cholesterolio perteklinio kaupimosi t.y. nuo aterosklerozės vystymosi [30]. Tai leidžia teigti, kad DTL pasižymi antiaterogeninėmis savybėmis [35, 32].

Pirmasis atvirkštinio cholesterolio transporto koncepciją išklė Glomset su kolegomis, kurie manė, kad DTL šio proceso metu apsaugo nuo koronarinės širdies ligos. DTL atlieka daug biologinių funkcijų [53]. *In vitro* tyrimai įrodė, kad DTL pasižymi antioksidacinėmis savybėmis, šią funkciją atlieka Apo AI, pasižymi ir priešuždegiminėmis savybėmis, slopina uždegimą skatinančių adhezijos molekulių raišką endotelio ląstelėse [30]. DTL pasižymi ir kitomis savybėmis: apsaugo endotelį ir atkuria jo funkcijas, skatina angiogenezę, dalyvauja monocitų bei neutrofilų sintezėje, azoto oksidą stimuliuojančiuose mechanizmuose, vaidina svarbų vaidmenį imuninių reakcijų metu ir kontroliuojant gliukozės homeostazę [31, 32].

Su aterosklerozės vystymusi yra siejami DTL subfrakcijų ir funkcijos pokyčiai, būdinga DTL₃ frakcijos padidėjimas [32].

1.3.3. Didelio tankio lipoproteinų apolipoproteinai

Apolipoproteinai tai baltymų kompleksai esantys lipoproteinų sudėtyje. Kiekvienas lipoproteinas turi skirtingus apolipoproteinus. Atliekant kiekybinius apolipoproteinų matavimus galima spręsti apie lipoproteinų apykaitos sutrikimus [24].

DTL sudėtyje esantys apolipoproteinai skiriasi savo mase ir atlieka tam tikras funkcijas (1 lentelė). Apolipoproteinai atlieka tris pagrindines funkcijas: aktyvuoja svarbiausius fermentus lipoproteinų metabolizme, išlaiko lipoproteinų komplekso struktūrinį vientisumą, palengvina lipoproteinų patekimą į ląsteles per ląstelių paviršiaus receptorius [6, 7]. DTL apolipoproteinai - Apo AI, AII, AIV, CI, CII, CIII, E (1 lentelė).

Apolipoproteinas A. Abu apolipoproteinai AI ir AII sudaro apie 90 procentų visų baltymų DTL dalelėje. Santykis Apo AI ir Apo AII yra 3:1. Pagrindinis DTL apolipoproteinas

AI sintetinamas kepenyse ir plonajame žarnyne [38, 30, 31]. Apo AI vaidina svarbų vaidmenį cholesterolio grįžtamajame kelyje, šis apolipoproteinas palengvina cholesterolio desorbciją. DTL ir Apo AI koncentracija kraujo serume neigiamai koreliuoja su aterosklerozės rizika [16].

Apo AI yra fermento lecitincholesterolaciltransferazės (LCAT) kofaktorius, šis fermentas atsakingas už cholesterolio esterų susidarymą plazmoje. Taigi Apo AI dėl savo gebėjimo jungtis ir katalizinio aktyvumo, sąveikauja su receptoriais ir skatina cholesterolio išsiskyrimą iš audinių į kepenis [17]. Šis apolipoproteinas yra pagrindinis cholesterolio transportavimo ir ląstelinio cholesterolio homeostazės tarpininkas. Taip pat pagrindinis DTL apolipoproteinas turi homologiją su prostaciklinu (PHI₂) ir pasižymi antioksidaciniu poveikiu, neleidžia trombams telktis kraujagyslės pažeidimo vietose. Taigi, Apo AI pasižymi antiaterogeniniu poveikiu [27].

Pagrindinė Apo AII funkcija yra slopinti lecitincholesterolaciltransferazę ir aktyvinti kepenų trigliceridų lipazes. Taip pat atlieka svarbų vaidmenį išlaikant didelio tankio lipoproteinų dydį ir kiekį kraujo plazmoje [31]. Apolipoproteino AIV pagrindinė funkcija iki šiol nėra aiški, tačiau *in vitro* buvo įrodyta, kad aktyvuoja lecitincholesterolaciltransferazę ir vaidina svarbų vaidmenį lipidų absorbcijoje žarnyne [7].

1 lentelė. Didelio tankio lipoproteinų (DTL) struktūroje esantys apolipoproteinai [17].

Apolipoproteinas	Molekulinė masė (Da)	Funkcija
Apo AI	29,016	LCAT kofaktorius
Apo AII	17,414	Nežinoma
Apo AIV	44,465	LCAT aktyvatorius
Apo CI	6630	LCAT aktyvatorius
Apo CII	8900	LPL kofaktorius
Apo CIII	8800	Apo CII inhibitorius, LPL aktyvatorius
Apo E	34,145	palengvina chilomikronų likučių ir TTL įsisavinimą

Apolipoproteinas C. Šis apolipoproteinas cirkuliuoja tarp DTL ir kitų lipoproteinų (chilomikronų, LMTL) [33]. Apo CI tai mažiausias apolipoproteinas iš visų Apo C tipų. *In vitro* tyrimais buvo įrodyta, kad jis aktyvuoja LCAT fermentą, tačiau *in vivo* funkcija nėra aiški. Kitas apolipoproteinas CII aktyvuoja fermentą lipoproteinlipazę (LPL), kuris hidrolizuoja lipoproteinų trigliceridus. Apo CIII slopina Apo CII ir lipoproteinlipazę [6].

Apolipoproteinas E. Šis apolipoproteinas yra kepenų ląstelių receptorių ligandas. Jo funkcija yra palengvinti chilomikronų liekanų ir tarpinio tipo lipoproteinų (TTL) patekimą į kepenų ląsteles [7].

1.3.4. Didelio tankio lipoproteinų apykaita

Didelio tankio lipoproteinai yra sintetinami kepenyse ir plonajame žarnyne (3 paveikslas) [30, 31]. Ultracentrifuguojant galima atskirti dvi pagrindines DTL frakcijas t.y. didelių DTL₂ ir mažesnes DTL₃, kurios toliau gali būti diferencijuojamos į DTL_{2b}, DTL_{2a}, DTL_{3a}, DTL_{3b} ir DTL_{3c}. DTL gali būti klasifikuojamas ir pagal jų pagrindinio apolipoproteino sudėtį: dalelės, kurių sudėtyje yra tik Apo AI (Apo AI, Lp AI) arba abu Apo AI ir Apo AII (Lp AI/AII) [11]. Kiti DTL atskyrimo būdai yra skysčių chromatografija, branduolinis magnetinis rezonansas [49].

DTL sintezė prasideda nuo jo pagrindinio apolipoproteino Apo AI sintezės kepenyse ir žarnyne. Disko formos, pirminiai – DTL₃ formuojasi iš Apo AI vykstant lipidacijai iš ląstelių, t.y. prisijungiant fosfolipidus ir laisvą cholesterolį tarpininkaujant nuo adenzintrifosfato priklausomam (ABCA1) pernešėjui. Besiformuojanti dalelė turi mažai cholesterolio [23]. Toks cholesterolis yra substratas lecitincholesterolaciltransferazei (LCAT). Kraujyje prie DTL struktūrinių elementų jungiasi LCAT, vyksta cholesterolio esterifikacija [31].

Cholesterolio esterijų sintezė didina galimybę didelio tankio lipoproteinams prisijungti didesnę laisvojo cholesterolio kiekį. Cholesterolio esteriai yra hidrofobiniai, todėl jie kaupiasi dalelės šerdyje, susidaro nebe disko DTL₃, o sferinės formos dalelė DTL₂ [24, 33]. Sferinės DTL dalelės gali daugiau prisijungti cholesterolio dėl nuo adenzintrifosfato priklausomo pernešėjo (ABCG1) ir B klasės I tipo receptoriaus-surinkėjo (SR – B1) [32].

Subrendę DTL gali keistis cholesterolio esteriais ir trigliceridais su mažo tankio lipoproteiniais (MTL) ir labai mažo tankio lipoproteiniais (LMTL) tarpininkaujant cholesterolio esterius pernešančiam baltymui CETP [23]. DTL į chilomikronus ir LMTL perneša Apo CII taip skatina trigliceridų skilimą ir aktyvina lipoproteinų lipazę (LPL). Šios reakcijos metu iš chilomikronų susidaro chilomikronų liekanos ir iš LMTL susidaro MTL [33].

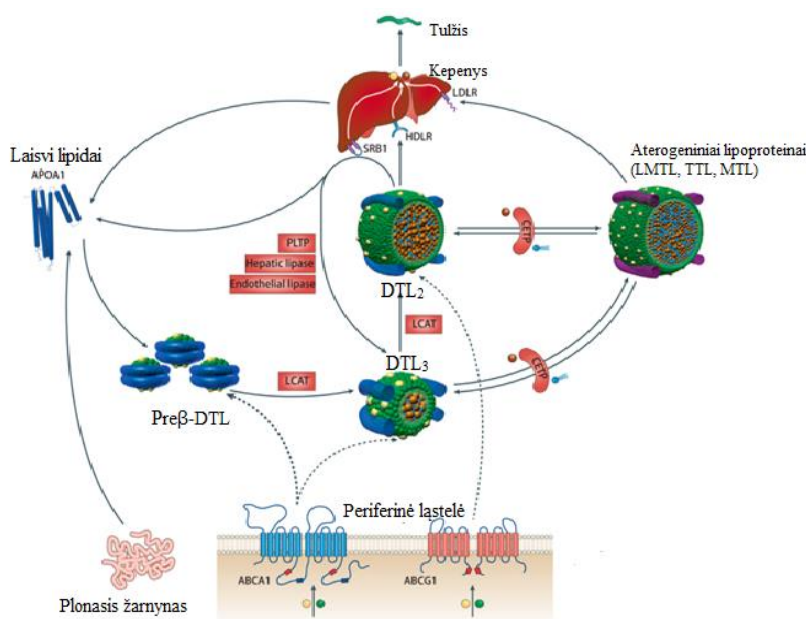
Subrendusi DLT yra sudaryta iš hidrofobinės šerdies, kurioje yra cholesterolio esteriai ir trigliceridai ir iš hidrofilinio paviršiaus, kuriame yra fosfolipidai ir apolipoproteinai. DTL cholesterolį nugabena į kepenis ir čia vyksta selektyvus cholesterolio esterijų iš DTL įsisavinimas per SR – B1 receptorių [23].

DTL₂ veikia kepenų fermentas trigliceridlipazė. Ši lipazė turi trigliceridhidrolazinį ir fosfolipazinį aktyvumą, dėl šio fermento DTL sumažėja trigliceridų ir fosfolipidų kiekis [33].

Du plazmos baltymai dalyvauja pakartotinai formuojant DTL dalelę: fosfolipidus pernešantis baltymas (PLTP) ir cholesterolio esterius pernešantis baltymas (CETP). CETP katalizuoja cholesterolio esterio transportavimą į Apo B – 100 turinčias daleles mainais už trigliceridus. PLTP palengvina fosfolipidų pernašą iš kitų lipoproteinų į DTL. Leidžia DTL dalelei augti įgijant paviršiniame sluoksnyje fosfolipidų. CETP vadinamas alternatyviu metabolizmo keliu [31]. DTL apolipoproteinai visiškai suskyla kepenyse, dalis žarnyne. DTL₂ koncentracija rodo cholesterolio šalinimo iš audinių veiksmingumą [33].

Nors DTL dalelės gali grįžti į kepenis netrukus po susiformavimo, didžioji dalis lieka cirkuluoti kelias dienas nuolat keisdami lipidais ir su kitomis lipoproteinų dalelėmis [31].

ŠKL atvejais dažniau nustatomos DTL₃ dalelės, o DTL₂ pasižymi apsauginiu poveikiu prieš ŠKL [30]. Žmonėms, kurie turi mažesnę DTL₂ kiekį kraujyje, manoma, kad gali būti padidėjusi rizika sirgti širdies ir kraujagyslių ligomis [31].



2 pav. DTL metabolinis kelias *in vivo* [22].

DTL funkcija gali sutrikti esant tam tikroms patologijoms: lėtiniam uždegimui, oksidaciniam stresui, cukriniam diabetui, dislipidemijai ir aterosklerozei. DTL dalelės gali pakisti sudėties ir struktūros atžvilgiu. DTL tokiomis sąlygomis gali prarasti savo antiaterogeninę funkciją [32].

1.4. Cholesterolio išnešimo geba

Didelio tankio lipoproteinų cholesterolio (DTL – Ch) mažas kiekis kraujo plazmoje yra vertinamas kaip pagrindinis rizikos veiksnys aterosklerozės, širdies ir kraujagyslių ligų vystymuisi [22, 44]. Tyrimų metu, buvo pastebėta, kad DTL – Ch nėra tinkamas parametras vertinant širdies ir kraujagyslių ligas, todėl buvo atkreiptas dėmesys į DTL metabolizmą [39, 41]. Remiantis naujausiais duomenimis DTL išnešamas cholesterolis iš makrofagų yra kliniškai svarbi šių lipoproteinų funkcija, nes rodo stiprų ryšį su intimos pakitimais, angiografijos tyrimo atsakymais, patvirtinančiais apie širdies ir kraujagyslių ligą, nepriklausomai nuo DTL – Ch koncentracijos [45, 15].

Pagrindinė DTL funkcija – grįžtamasis cholesterolio transportas [21, 41]. Tai sudėtingas procesas, kurio metu iš periferinių audinių surenkamas perteklinis cholesterolio kiekis ir jis nugabenamas į kepenis ir per tulžį pašalinamas [14]. Manoma, kad cholesterolio išnešimo geba yra aktyvus grįžtamojo cholesterolio transporto etapas [9]. Cholesterolio išnešimo geba priklauso nuo pagrindinių kelių 1) vandeninės difuzijos; 2) SR – B1 – B klasės I tipo receptorių – surinkėjų; 3) ABCG1 – nuo ATP priklausomo pernešėjo G1 4) ABCA1 – nuo ATP priklausomo pernešėjo A1. Visi šie keliai prisideda prie cholesterolio pašalinimo iš ląstelių, bet yra atsakingas ABCA1 už normalų cholesterolio kiekį audiniuose [45]

Nuo ATP priklausomas pernešėjas A1 (ABCA1), skatina laisvojo cholesterolio pernešimą iš makrofagų į lipidų neturinčią Apo AI t.y. pre β – 1 DTL [21]. Daugelis tyrimų teigia, kad vienas iš svarbiausių DTL apolipoproteinų yra Apo AI. Jis iš makrofagų išneša apie 75 – 80 proc. cholesterolio [40]. Apie trečdalis cholesterolio išnešamas iš makrofagų tarpininkaujant ABCA1, tai buvo įrodyta cholesterolį pažymėjus fluorescencine žyme [44]. Nuo kitų svarbių pernešėjų ABCG1 ir SR – B1 receptorių priklauso DTL dalelės subrendimas ir cholesterolio išnešimo gebos efektyvumas. DTL₂ prie hepatocitų prisijungia per SR – B1 receptorių ir skatina cholesterolio esterių (CE) įsisavinimą iš DTL į kepenis [15]. Iš kepenų su tulžimi cholesterolis pašalinamas į virškinamąjį traktą.

Taigi grįžtamasis cholesterolio transportas atspindi pagrindinę DTL biogenezę, nuo besiformuojančių lipidų mažai turinčių dalelių iki subrendusių cholesterolio esterius prisijungusių sferinių dalelių. Šis transportas palaiko ląstelių homeostazę ir gerai veikia gyvūnų modeliuose [39, 40]. *In vitro* cholesterolio išnešimo metodai leidžia nustatyti cholesterolio išnešimo gebą iš augintų ląstelių. Dažniausiai tyrimui yra naudojami pelių makrofagai [52]. Žymėto cholesterolio išnešimas iš makrofagų yra jautrus cholesterolio kiekio nustatymo metodas, vyraujantis atliekant DTL cholesterolio išnešimo gebos tyrimus [15].

Cholesterolio išnešimo gebos matavimai tiek gyvūnų modeliuose, tiek žmonėse yra susiję su ateroskleroze. Dabar pagrindinis cholesterolio išnešimo gebos metodo tikslas įrodyti ryšį su širdies ir kraujagyslių ligomis būtent žmonių tyrimuose [37, 4].

Jungtinėse Amerikos Valstijose atliktas kohortos tyrimas teigia, kad cholesterolio išnešimo geba (matuojant skirtingais tyrimo metodais) buvo atvirkščiai susijusi su širdies ir kraujagyslių ligomis. Apie keturis dešimtmečius trukusi hipotezė, kad yra reikšmingas ryšys tarp DTL – Ch, ir širdies ir kraujagyslių ligų tapo abejotina [44].

Iki šiol atlikti tyrimai patvirtina, kad cholesterolio išnešimo geba gali būti patikimai įvertinta naudojant žmogaus kraujo mėginius ir gali būti perspektyviai naudojama kaip naujas žymuo aterosklerozės ligai vertinti [41]. Kol kas nėra standartizuoto cholesterolio išnešimo gebos metodo skirta klinikinei praktikai, tačiau atlikta nemažai eksperimentinių darbų kuriuose išmatuotas žymėto cholesterolio perėjimas iš ląstelių į ekstraląstelinius akceptorius [39].

Fluorescencinis cholesterolio išnešimo gebos metodas keičia radioizotopais žymėtą metodą. Spektrofotometriniu metodu pritaikytas taip, kad gana tiksliai atvaizduotų cholesterolio išnešimo gebą. Naujas metodas pranašesnis dėl trumpesnio atlikimo laiko ir tikslesnio cholesterolio išnešimo gebos nustatymo [47, 45]. Cholesterolio išnešimo geba yra itin geras žymuo dėl to, kad priešingai nei DTL – Ch minimaliai koreliuoja su rizikos veiksniais. Yra atvirkščiai susijęs su širdies ir kraujagyslių ligomis. Cholesterolio išnešimo geba nepriklauso nuo DTL – Ch koncentracijos ir gali suteikti galimybę ištirti pagrindinius mechanizmus susijusius su širdies ir kraujagyslių ligomis [41]. Taigi, cholesterolio išnešimo geba tai žymuo, kuris ateityje padės tiksliau įvertinti riziką formuoti aterosklerozinei plokštei ir taip pat bus naudojamas gydymo efektyvumui stebėti.

2. TYRIMO METODAI IR APIMTIS

2.1. Tiriamoji grupė

Į tyrimą buvo įtraukta 50 didelės kardiovaskulinės rizikos pacientų, besilankiusių Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikose pagal širdies ir kraujagyslių prevencinę programą. Kontrolinę grupę sudarė pagal amžių atrinkti sveiki asmenys. Veninis kraujas tyrimams buvo imamas ryte nevalgius į mėgintuvėlį su geliu ir krešėjimo sistemos aktyvatoriais (mėgintuvėlis geltonu kamšteliu). Kraujas 10 minučių centrifuguotas 3000 aps./min greičiu ir serumas laikytas – 80 °C temperatūroje.

2.2. Tyrimo metodai

2.2.1. Lipidų apykaitos rodiklių nustatymas

Pacientams buvo nustatyti lipidų apykaitos rodikliai: bendras cholesterolis (B – Ch), triacilgliceroliai (TAG), didelio tankio lipoproteinai (DTL – Ch), mažo tankio lipoproteinai (MTL – Ch). B – Ch, TAG, DTL – Ch, MTL – Ch koncentracijos pacientų kraujo serumuose buvo nustatomos Architect ci8200 analizatoriumi („Abbot“, JAV). Buvo naudojami reagentų rinkiniai („Abbot Laboratories“, Vokietija) ir vidaus kokybės kontrolės serumai.

Bendrojo cholesterolio koncentracija kraujo serume nustatyta fermentiniu (cholesterolesterazės/cholesteroloksidazės) metodu. Metodo principas: cholesterolio esterius fermentas cholesterolio esterazė hidrolizuoja į cholesterolį ir laisvasias riebalų rūgštis. Laisvą cholesterolį ir susidariusį cholesterolį (iš cholesterolio esterių) oksiduoja fermentas cholesterolio oksidazė iki cholest – 4 – ono – 3 – ono ir vandenilio peroksido (H₂O₂). Susidaręs vandenilio peroksidas reakcijos metu reaguoja su hidroksibenzoine rūgštimi ir 4 – aminoantipiridinu. Susidaro galutinis spalvotas reakcijos produktas (chinonas). Šis dažas absorbuoja šviesą ties 500 nm. Šviesos sugerties pokyčiai yra tiesiogiai proporcingi cholesterolio koncentracijai kraujo serume. Rekomenduojama B – Ch koncentracija kraujo serume (<5,2 mmol/L).

Triacilglicerolių (TAG) koncentracija kraujo serume nustatyta fermentiniu (glicerolfosfatoksidazės) metodu. Metodo principas: triacilgliceroliai esantys kraujo serume veikiami fermento lipazės ir hidrolizuojami iki glicerolio ir laisvų riebalų rūgščių. Glicerolį fosforilina adenozino trifosfatas (ATP), ir veikiant fermentui glicerolkinazei fosforilinamas iki glicerolio – 3 – fosfato ir adenozindifosfato (ADP). Susidaręs glicerolio-3 – fosfatas yra oksiduojamas fermento glicerolfosfatoksidazės iki dihidroksiacetono fosfato (DAP) ir

vandenilio peroksido (H_2O_2). Vandenilio peroksidas reaguoja su peroksidaze, 4 – aminopiridinu, 4 – chlorfenoliu ir sudaro spalvotą junginį, kuris absorbuoja šviesą ties 500 nm. Šviesos sugerties pokyčiai yra tiesiogiai proporcingi triacilglicerolių koncentracijai kraujo serume. Rekomenduojama TAG koncentracija kraujo serume yra ($<1,7$ mmol/L).

DTL cholesterolio koncentracija kraujo serume nustatyta fermentiniu (cholesterolesterazės/cholesteroloksidazės) metodu. DTL cholesterolio nustatymas susideda iš dviejų etapų, kiekviename etape yra naudojami skirtingi reagentai. Pirmojo etapo metu yra blokuojamas ne DTL cholesterolis, o esantis kituose lipoproteinuose MTL, LMTL ir chilomikronuose, veikiant fermentui cholesterolesterazei. Susidaręs vandenilio peroksidas (H_2O_2) veikiamas peroksidazės ir DSBmT reagento (N, N – bis (4 – sulfobutil) – m – toluidino – dinatris) sudaro nespaltvotą junginį, kuris yra galutinis reakcijos produktas. Antrojo etapo metu, naudojant detergentą ištirpinamas DTL cholesterolis ir išlaisvinami jame esantys cholesterolio esteriai. Juos paveikus fermentais cholesterolesteraze ir oksidaze, susidaro cholestenonas ir vandenilio peroksidas (H_2O_2). Vandenilio peroksidas reaguodamas su 4 – aminoantipirinu ir DSBmT reagentu sudaro spalvotą junginį, kuris absorbuoja šviesą 500 nm. Pagal šviesos absorbcijos pokytį yra nustatoma DTL cholesterolio koncentracija kraujo serume. Rekomenduojama DTL – Ch koncentracija kraujo serume ($>0,91$ mmol/l) vyrams ir ($>1,21$ mmol/l) moterims.

MTL cholesterolio koncentracija tiriamųjų pacientų kraujo serume buvo nustatoma dviem būdais:

- 1) apskaičiuojant pagal Friedvaldo formulę;
- 2) tiesioginiu (automatizuotu), dviejų pakopų fermentiniu (cholesterolesterazės/cholesteroloksidazės), jei TAG $>4,5$ mmol/L.

Friedvaldo formulė, kuria apskaičiuojama MTL cholesterolio koncentracija tiriamajame mėginyje:

$$\text{MTL cholesterolis (mmol/l)} = \text{B} - \text{Ch} - (\text{DTL} - \text{Ch} + \text{TAG}/2,22)$$

TAG/2,2 atspindi LMTL cholesterolio kiekį mmol/l. Tiesioginis MTL cholesterolio nustatymo metodas panašus į DTL cholesterolio metodą. Pirmiausia, naudojant reagentą yra ištirpinamas ne MTL cholesterolis o esantis DTL, LMTL ir chilomikronuose, kuris vėliau veikiant cholesterolio esterazei, oksidazei ir peroksidazei sudaro nespaltvotą junginį (galutinis reakcijos produktas). Antrasis MTL cholesterolio išskyrimo etapas susideda iš viena po kitos sekančių reakcijų, kurių metu naudojant specialų detergentą yra ištirpinami MTL ir išlaisvinami

jose esantys cholesterolio esteriai. Juos paveikus fermentais cholesterolio esteraze ir oksidaze, susidaro cholestenonas ir vandenilio peroksidas (H_2O_2). Vandenilio peroksidas reaguodamas su 4 – aminoantipirinu ir DSBmT reagentu sudaro spalvotą junginį, kuris absorbuoja šviesą 500 nm. Pagal šviesos absorbcijos pokytį yra nustatoma MTL cholesterolio koncentracija kraujo serume. Rekomenduojama MTL – Ch koncentracija kraujo serume ($<3,4$ mmol/L).

2.2.2. Apolipoproteinų nustatymas

Pacientams taip pat atlikti apolipoproteinų tyrimai: apolipoproteinas AI (Apo AI), apolipoproteinas AII (Apo AII), apolipoproteinas B (Apo B), apolipoproteino B ir apolipoproteino AI santykis (Apo B/Apo AI), apolipoproteinas E (Apo E), lipoproteinas a (Lp a). Apolipoproteinai pacientų kraujo serume buvo nustatyti Siemens „BN II“ analizatoriumi (Vokietija). Buvo naudojami reagentų rinkiniai („Siemens“, Vokietija). Šiuo analizatoriumi apolipoproteinai pacientų kraujo serume nustatomi nefelometrijos metodu.

Nefelometrija – metodas, kuriuo atliekamas imunocheminis baltymų nustatymas serume. Taikant šį metodą matuojama šviesa 840 nm bangos ilgyje išsklaidyta ant Ag – Ak kompleksų. Matuojamas tirpalo drumstumas. Ag – Ak kompleksai susidaro reaguojant mėginyje esantiems Ag su atitinkamais antiserumais. Išmatuotas išsklaidytos šviesos intensyvumas yra proporcingas Ag – Ak kompleksų kiekiui. Standartinė kreivė su žinomu Ag kiekiu padeda įvertinti tiriamo mėginio išsklaidytos šviesos intensyvumą ir apskaičiuoti Ag koncentraciją.

Apo AI ir Apo B. Metodo principas: baltymai esantys žmogaus kraujo serume formuoja imuninius kompleksus su specifiniais Ak. Šie kompleksai išsklaido šviesos spindulį einantį per mėginį. Išsklaidytos šviesos intensyvumas yra proporcingas tam tikro apolipoproteino (Apo AI ar Apo B) esančio kraujo serume koncentracijai. Rezultatai yra vertinami su standarine žinoma koncentracija. Rekomenduojamos Apo AI ir Apo B taip pat Apo B/Apo AI santykio koncentracijos kraujo serume: Apo AI vyrams (1,1 – 2,05 g/L), moterims (1,25 – 2,15 g/L). Apo B vyrams (0,55 – 1,4 g/L), moterims (0,55 – 2,15 g/L). Apo B/Apo AI vyrams (0,35 – 1,0 g/L), moterims (0,3 – 0,9 g/L).

Apo AII ir Apo E. Imunocheminėje reakcijoje baltymai esantys žmogaus serume formuoja imuninius kompleksus su specifiniais Ak. Išsklaidytos šviesos intensyvumas yra proporcingas tam tikro apolipoproteino (Apo AII ar Apo E) esančio kraujo serume koncentracijai. Rezultatai yra vertinami su standarine žinoma koncentracija.

Rekomenduojamos Apo AII ir Apo E koncentracijos kraujo serume Apo AII (0,26 – 0,51 g/L), Apo E (0,023 – 0,063 g/L).

Lp a. Metodo principas: polistireno dalelės yra padengtos specifiniais Ak prieš žmogaus Lp a. Tos dalelės sumaišomos su tiriamais mėginiais. Susidarę junginiai išsklaido šviesą, ir išsklaidytos šviesos intensyvumas yra proporcingas Lp a koncentracijai kraujo serume. Rezultatai lyginami su standartine žinoma koncentracija. Rekomenduojama Lp a koncentracija kraujo serume (0,02 – 0,46 g/L).

2.2.3. Įrenginiai ir priemonės

- Automatinė pipetė („Eppendorf“, Vokietija);
- Centrifūga („Hettich“, Vokietija);
- Centrifūga („Open 3“, Rusija);
- Centrifūginiai mėgintuvėliai;
- Flakonai 50 mL („Falcon“, JAV);
- Fuks – Rozantolio kamera (Vokietija);
- Inversinis mikroskopas („CETI“, Belgija)
- Maišytuvas platforminis „BioSan PSU 2 T“;
- Mėgintuvėliai 15 mL („Falcon“, JAV);
- Pipečių pritraukėjas („Falcon“, JAV);
- Spektrofotometras („SpectraMax i3“, JAV);
- Šaldymo sistema (- 80 °C) („Fiocchetti“, Italija);
- Šviesinis mikroskopas („CETI“, Belgija);
- Termostatas (37 °C, 5% CO₂; NuAire, JAV);
- Traukos spinta („Telstar“, Ispanija);
- Vandens vonelė (37 °C) („BioSan WB4“, Latvija);
- 96 šulinėlių plokštelė/juoda („Falcon“, JAV).

2.2.4. Reagentai

- Antibiotikai („Biological Industries“, JAV);
- BioVision (JAV) rinkinys „Cholesterol Efflux Fluorometric Assay Kit (cell-based)“:
 - Žymėjimo reagentas (5 mL);

- Pusiausvyrinis buferis (5 mL);
- Reagentas A (10 mL);
- Reagentas B (10 mL);
- Ląstelių lizės buferis (20 mL);
- Teigiama kontrolė (1 mL);
- Serumo apdorojimo reagentas (1 mL).
- Dezinfektantas („*Bacillol AF*“, Vokietija);
- Etanolis (96°) („*UAB Gintarinė vaistinė*“);
- Fetalinis jaučiuko serumas („*Biological Industries*“, JAV);
- Fosfatinio buferio tirpalas („*Lonza*“, Belgija);
- Ląstelių linija J774 a.1 („*ATCC*“, JAV);
- RPMI – 1640 terpė („*Biological Industries*“, JAV);
- Tripano mėlis („*Lonza*“, Belgija);
- Tripsinas („*Lonza*“, Belgija);

2.2.5. Ląstelių kultivavimas

Ląstelės J744a.1 gautos užšaldytos sausame lede (– 60°C). Kitos dienos rytą jos atšildytos vandens vonelėje (37°C) ir perkeltos į flakoną su 1% antibiotikų, 10% fetalinio jaučiuko serumo ir terpe (RPMI – 1640). Flakonai su ląstelėmis laikyti 37°C termostate su 5% CO₂. Ląstelių užaugimas buvo stebimas kiekvieną dieną ir vedamas protokolas.

Kai ląstelių užaugimas pasiekė 90 %, jos buvo dalintos. Dalinimo procedūrai buvo naudotas fosfatinis buferinis tirpalas (2 mL), juo praplautos ląstelės ir fosfatinis buferinis tirpalas praplovus pašalintas iš flakono. Tuomet ląstelės paveiktos 1 mL tripsinu, kuris veikia lizuojančiai, kad ląstelės atkibtų nuo flakono paviršiaus ir 8 min laikomos termostate (37°C ir 5% CO₂). Ši ląstelių linija pasižymi tuo, kad jos yra adhezinės (didžioji dalis) ir yra suspensijos ląstelių (mažoji dalis). Tam, kad atkabinti pilnai ląsteles jos mechaniškai atkabintos automatinės pipetės pagalba prieš tai įpilant 1 mL paruoštos terpės.

Inversiniu mikroskopu stebėta ar ląstelės atsikabino. Jei ląstelės atsikabino, tripsino veikimas stabdytas 4 mL paruoštos terpės. Iš flakono išsiurbtas ląstelių, tripsino ir terpės mišinys perkeltas į mėgintuvėlį ir centrifuguota 5 min 1500 aps./min greičiu, po nusukimo supernatantas pašalintas. Į nusėdusias ląsteles įpilama 1 mL paruoštos terpės.

Stebėta koks gyvybingų ląstelių kiekis perkeltas po dalinimo, tam naudota Fuks – Rozantolio kamera, imta 90 μL tripano mėlio ir 10 μL ląstelių, šie du komponentai sumaišyti ir dėti į ląstelių skaičiavimui skirtą kamerą. Stebėta šviesiniu mikroskopu. Jei ląstelių membrana pažeista, ląstelėje kaupiasi tripano mėlis. Paskaičiavus 4 laukus ir įvertinus, kad gyvybingumas didelis, tada automatine pipete suspenduota ląstelių kultūra mėgintuvėlyje ir paimta 250 μL ląstelių, perkelta į naują flakoną su 5 mL šviežiai paruoštos terpės.

2.2.6. Cholesterolio išnešimo geba

2.2.6.1. Ląstelių žymėjimas

Tyrimas buvo atliekamas su *BioVision* rinkiniu „Cholesterol Efflux Fluorometric Assay Kit (cell – based)“. Tyrimui naudota ląstelių linija *J774a.1* (pelių makrofagai).

Ląstelės augintos tol kol pasiekė 90%, t.y. (1×10^5) užaugimą. Tuomet perkeltos į 96 šulinėlių lėkštelę. Naudota RPMI – 1640 (100 μL) be priemaišų. Inkubuota 2 valandas, kol ląstelės prikibo prie lėkštelės. Terpė nusiurbta ir ląstelės praplautos RPMI – 1640 (100 μL) be priedų, terpė palikta.

Į šulinėlius buvo pilamas žymėjimo reagentas ir pusiausvyrinis buferis (su A ir B reagentais), po 100 μL mišinio į vieną lėkštelės šulinėlį. Paruošta pirma kontrolė 100 μL pusiausvyrinis buferis (su A ir B reagentais), be žymėjimo reagento. Inkubuota 16 valandų. Po žymėjimo pašalintas mišinys, ląstelės praplautos terpe RPMI – 1640 be priedų, terpė pašalinta.

2.2.6.2. Serumo paruošimas

Serumas buvo ruoštas įdėjus dvi dalis serumo apdorojimo reagento ir penkias dalis paciento serumo, santykis (2:5) t.y. 10 μL serumo apdorojimo reagento ir 25 μL pacientų serumo. Centrifuguota 10 min 4°C temperatūroje 9000 aps./min greičiu. Tuomet nucentrifuguoti pacientų serumai perkelti į 96 šulinėlių lėkštelę (kiekvieno paciento serumas į skirtingą šulinėlį) po 35 μL . Įpilta RPMI – 1640 iki 100 μL (t.y. 65 μL). Pagaminta antra kontrolė – teigiamos kontrolės reagento (20 μL) ir RPMI – 1640 (80 μL) iš viso 100 μL . Į pirmą kontrolę įpilta RPMI – 1640 (100 μL). Inkubuota 4 valandas.

2.2.6.3. Cholesterolio išnešimo gebos matavimai

Mėginiai buvo perkelti į kitą 96 šulinėlių lėkštelę fluorescencijos matavimui po 100 µL (viena šulinėlyje vieno paciento serumas su terpe). Ląstelės po supernatanto nusiurbimo paveiktos lizės buferio (100 µL) ir kratomos 30 min. platforminiame maišytuve kambario temperatūroje, po to automatinė pipete suspenduota, kad ląstelės galutinai suirtų. Spektrofotometru matuota fluorescencija 482nm/515nm bangos ilgyje. Fluorescencija matuota atskirai mėginyje (serumas su terpe) ir fluorescencija ląstelių lizate. Cholesterolio išnešimo geba apskaičiuota pagal formulę:

$$\text{Cholesterolio išnešimo geba (\%)} = \frac{\text{FL (S + T)}}{\text{FL (S + T)} + \text{FL (L)}} \times 100$$

FL (S + T) yra nusiurbto serumo ir terpės mišinio fluorescencijos intensyvumas;

FL (S) ląstelių lizato fluorescencijos intensyvumas.

2.3. Statistinė analizė

Statistinė analizė atlikta su *SPSS 23.0* ir *Microsoft Excel 2013* programomis. Tyrimo analizei pasirinktas aprašomosios statistikos metodas. Dviejų grupių pacientų atsakymų homogeniškumui atskirų kintamųjų atžvilgiu lyginimui aritmetinio vidurkio principu naudotas Stjudento T kriterijus dviem nepriklausomoms imtims (kai duomenys pasiskirstę pagal normaliosios Gauso kreivės skirstinį) ir Mann Whitney kriterijus (kai duomenys pasiskirstę ne pagal normaliosios Gauso kreivės skirstinį). Koreliacija buvo skaičiuojama pagal Spirmano koreliacijos koeficientą. Rezultatai buvo laikomi statistiškai reikšmingais, kai $p < 0,05$.

3. TYRIMO REZULTATAI

3.1. Bendras cholesterolis įskaitant lipidų apykaitos rodiklius

Tyrimė dalyvavo 95 pacientai, nuo 27 iki 60 metų. Jie buvo suskirstyti į keturias grupes: sveikos moterys (n=24), moterys, sergančios dislipidemija (n=24), sveiki vyrai (n=24) ir vyrai, sergantys dislipidemija (n=23). Pacientams buvo nustatyti lipidų apykaitos rodikliai (B – Ch, TAG, DTL – Ch, MTL – Ch) ir apolipoproteinų (Apo AI, Apo B, Apo AII, Apo E, Apo B/Apo AI, Lp a) koncentracija. 2 ir 3 lentelėse pateiktos tiriamųjų bendrojo cholesterolio ir lipidų apykaitos rodiklių charakteristikos.

2 lentelė. Bendras cholesterolis ir lipidų apykaitos rodikliai.

Rodikliai	Mediana (Q ₃ – Q ₂)	p reikšmė
B – Ch, mmol/L	5,38 (7,82 – 4,57)	>0,01
TAG, mmol/L	1,19 (1,98 – 0,83)	>0,01
DTL – Ch, mmol/L	1,35 (1,58 – 1,07)	0,02
MTL – Ch, mmol/L	3,23 (5,45 – 2,68)	>0,01

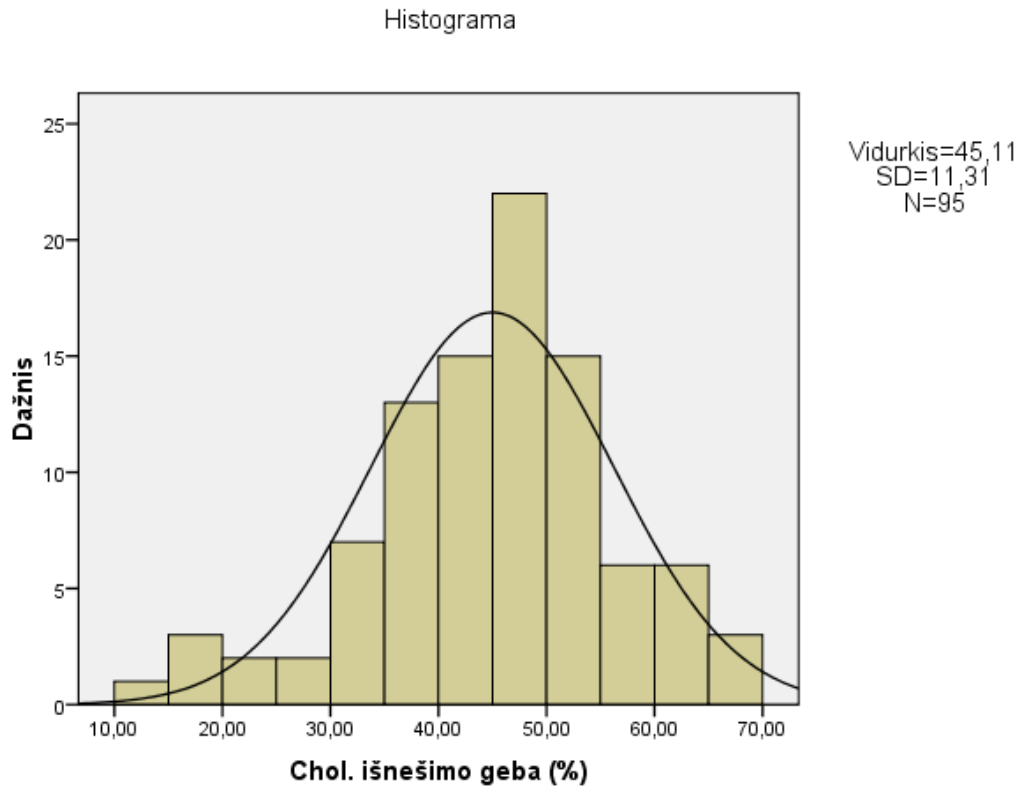
3 lentelė. Apolipoproteinų apykaitos rodikliai.

Rodikliai	Mediana (Q ₃ – Q ₂)	p reikšmė
Apo AI, g/L	1,68 (1,95 – 1,51)	>0,01
Apo B, g/L	0,92 (1,5 – 0,74)	>0,01
Apo AII, g/L	0,33 (0,37 – 0,31)	>0,01
Apo E, g/L	51 (68 – 38)	>0,01
Apo B/Apo AI, g/L	0,55 (0,89 – 0,44)	>0,01
Lp a, g/L	0,7 (0,27 – 0,03)	>0,01

Bendro cholesterolio ir kitų lipidų apykaitos rodiklių pasiskirstymas buvo įvertintas Shapiro – Wilk testu, duomenys pasiskirstę ne pagal normalųjį skirstinį, todėl šie duomenys buvo analizuojami neparametriniu Mann Witney testu (p<0,05).

3.2. DTL cholesterolio išnešimo geba

Tiriamiesiems buvo apskaičiuota cholesterolio išnešimo geba. Cholesterolio išnešimo gebos pasiskirstymas įvertintas Shapiro - Wilk testu. Nustatyta, kad duomenys pasiskirstę pagal normalųjį skirstinį (3 pav.).



3 pav. Cholesterolio išnešimo gebos histograma.

Kadangi cholesterolio išnešimo gebos skirstinys atitinka normaliąją Gauso kreivę, todėl duomenims analizuoti tarp grupių buvo naudotas Stjudento T kriterijus. Aprašomoji cholesterolio išnešimo gebos statistika pateikiama 4 lentelėje.

4 lentelė. Aprašomoji cholesterolio išnešimo gebos statistika.

Rodikliai	Vidurkis \pm SD	Min.	Maks.	p reikšmė
Cholesterolio išnešimo geba (%)	45,11 \pm 11,31	13,06	69,16	0,22

3.3. Cholesterolio išnešimo gebos ir lipidų apykaitos rodiklių ryšys

Siekiant įvertinti cholesterolio išnešimo gebos ir lipidų apykaitos rodiklių tarpusavio ryšį buvo apskaičiuotas Spirmano koreliacijos koeficientas, jis parodė, kad nėra sąsajos tarp cholesterolio išnešimo gebos ir lipidų apykaitos rodiklių (5 ir 6 lentelė).

5 lentelė. Cholesterolio išnešimo gebos ir lipidų apykaitos ryšys.

Rodiklis	Cholesterolio išnešimo geba (%)	
	r koreliacijos koeficientas	p reikšmė
Tiriamieji (N=95)		
B – Ch, mmol/L	–0,08	0,46
TAG, mmol/L	0,01	0,98
DTL – Ch, mmol/L	–0,09	0,35
MTL – Ch mmol/L	–0,06	0,56

6 lentelė. Cholesterolio išnešimo gebos ir apolipoproteinų ryšys.

Rodiklis	Cholesterolio išnešimo geba (%)	
	r koreliacijos koeficientas	p reikšmė
Tiriamieji (N=95)		
Apo AI, g/L	–0,1	0,93
Apo B, g/L	–0,7	0,49
Apo AII, g/L	0,04	0,7
Apo E, g/L	–0,13	0,21
Apo B/Apo AI, g/L	–0,09	0,39
Lp a, g/L	–0,04	0,74

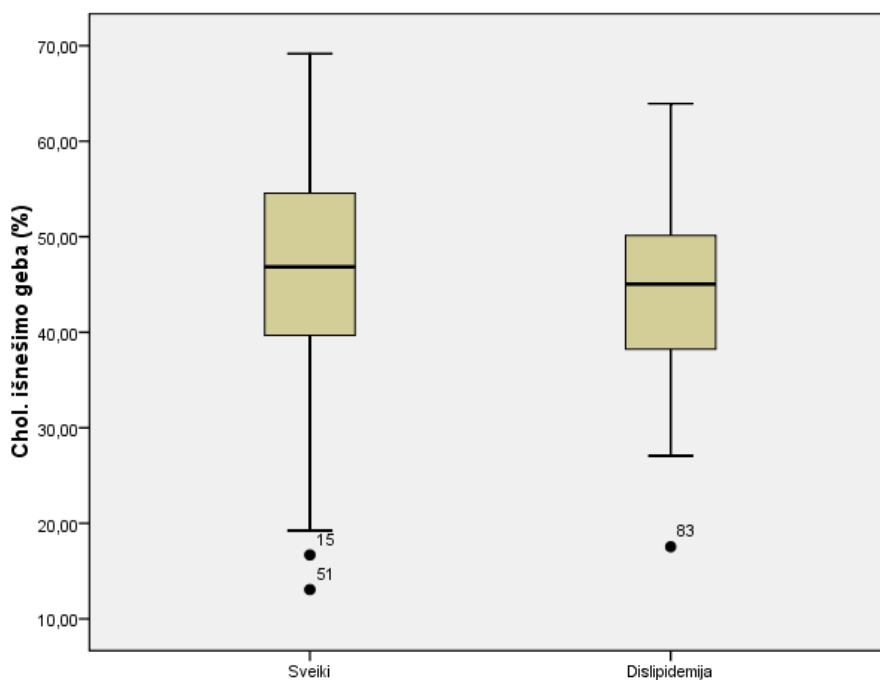
1.5. Cholesterolio išnešimo geba tarp sveikų ir sergančių dislipidemija pacientų

Iš pradžių buvo lyginti sveiki ir dislipidemija sergantys pacientai, 4 paveiksle ir 7 lentelėje pateiktos cholesterolio išnešimo gebos charakteristikos tarp sveikų ir dislipidemija sergančių pacientų.

7 lentelė. Cholesterolio išnešimo geba tarp sveikų ir dislipidemija sergančių pacientų.

	Rodikliai	Vidurkis \pm SD	p reikšmė
Cholesterolio išnešimo geba (%)	Sveiki	46,25 \pm 12,94	0,32
	Dislipidemija	43,95 \pm 9,35	

Cholesterolio išnešimo geba tarp sveikų ir dislipidemija sergančių pacientų statistiškai reikšmingai nesiskyrė ($p=0,32$).



4 pav. Cholesterolio išnešimo geba tarp sveikų ir dislipidemija sergančių pacientų.

Tarp sveikų ir dislipidemija sergančių pacientų didžioji dalis lipidų apykaitos rodiklių statistiškai reikšmingai skyrėsi (8 – 9 lentelė).

8 lentelė. Bendras cholesterolis ir lipidų apykaitos rodikliai tarp sveikų ir dislipidemija sergančių pacientų.

	Sveiki	Dislipidemija	p reikšmė
Rodikliai	Mediana (Q ₃ – Q ₁)	Mediana (Q ₃ – Q ₁)	
B – Ch, mmol/L	4,61 (5,2 – 4,16)	7,82 (9,07 – 6,41)	<0,01
TAG, mmol/L	0,87 (1,13 – 0,7)	1,96 (2,53 – 1,3)	<0,01
DTL – Ch, mmol/L	1,4 (1,63 – 1,16)	1,3 (1,47 – 1,01)	0,03
MTL – Ch, mmol/L	2,82 (3,17 – 2,48)	5,4 (6,32 – 3,7)	<0,01

9 lentelė. Apolipoproteinų apykaitos rodikliai tarp sveikų ir dislipidemija sergančių pacientų.

	Sveiki	Dislipidemija	
Rodikliai	Mediana (Q ₃ – Q ₁)	Mediana (Q ₃ – Q ₁)	p reikšmė
Apo AI, g/L	1,71 (1,99 – 1,5)	1,64 (1,93 – 1,51)	0,2
Apo B, g/L	0,76 (0,85 – 0,7)	1,5 (1,72 – 1,16)	<0,01
Apo AII, g/L	0,33 (0,35 – 0,3)	0,34 (0,38 – 0,31)	0,08
Apo E, g/L	43 (53,75 – 34)	65 (88 – 49)	<0,01
Apo B/Apo AI, g/L	0,44 (0,52 – 0,38)	0,89 (1,09 – 0,74)	<0,01
Lp a, g/L	0,04 (0,13 – 0,02)	0,12 (0,34 – 0,05)	0,01

3.5. Cholesterolio išnešimo gebos ir lipidų apykaitos rodiklių ryšys tarp sveikų ir sergančių dislipidemija pacientų

Siekiant įvertinti cholesterolio išnešimo gebos ir lipidų apykaitos ryšį buvo apskaičiuotas Spirmano koreliacijos koeficientas (10 – 13 lentelė), jis parodė, kad yra vidutiniška neigiama koreliacija ($r = -0,33$) tarp cholesterolio išnešimo gebos ir DTL – Ch yra statistiškai reikšminga ($p=0,03$) dislipidemija sergantiems pacientams (12 lentelė). Sveikiems asmenims ryšys tarp cholesterolio išnešimo gebos ir lipidų apykaitos rodiklių nerastas (10 – 11 lentelė).

10 lentelė. Cholesterolio išnešimo gebos ir lipidų apykaitos ryšys tarp sveikų pacientų.

Rodiklis	Cholesterolio išnešimo geba (%)	
	r koreliacijos koeficientas	p reikšmė
Tiriamieji (N=95)		
B – Ch, mmol/L	0,09	0,56
TAG, mmol/L	0,01	0,93
DTL – Ch, mmol/L	0,03	0,93
MTL – Ch mmol/L	0,1	0,49

11 lentelė. Cholesterolio išnešimo gebos ir apolipoproteinų ryšys tarp sveikų pacientų.

Rodiklis	Cholesterolio išnešimo geba (%)	
	r koreliacijos koeficientas	p reikšmė
Tiriamieji (N=95)		
Apo AI, g/L	-0,04	0,81
Apo B, g/L	0,11	0,48
Apo AII, g/L	0,18	0,23
Apo E, g/L	-0,24	0,1
Apo B/Apo AI, g/L	0,01	0,92
Lp a, g/L	-0,1	0,52

12 lentelė. Cholesterolio išnešimo gebos ir lipidų apykaitos ryšys tarp dislipidemija sergančių pacientų.

Rodiklis	Cholesterolio išnešimo geba (%)	
	r koreliacijos koeficientas	p reikšmė
Tiriamieji (N=95)		
B – Ch, mmol/L	-0,05	0,74
TAG, mmol/L	0,18	0,23
DTL – Ch, mmol/L	-0,33*	0,03
MTL – Ch mmol/L	-0,1	0,93

13 lentelė. Cholesterolio išnešimo gebos ir apolipoproteinų ryšys tarp dislipidemija sergančių pacientų.

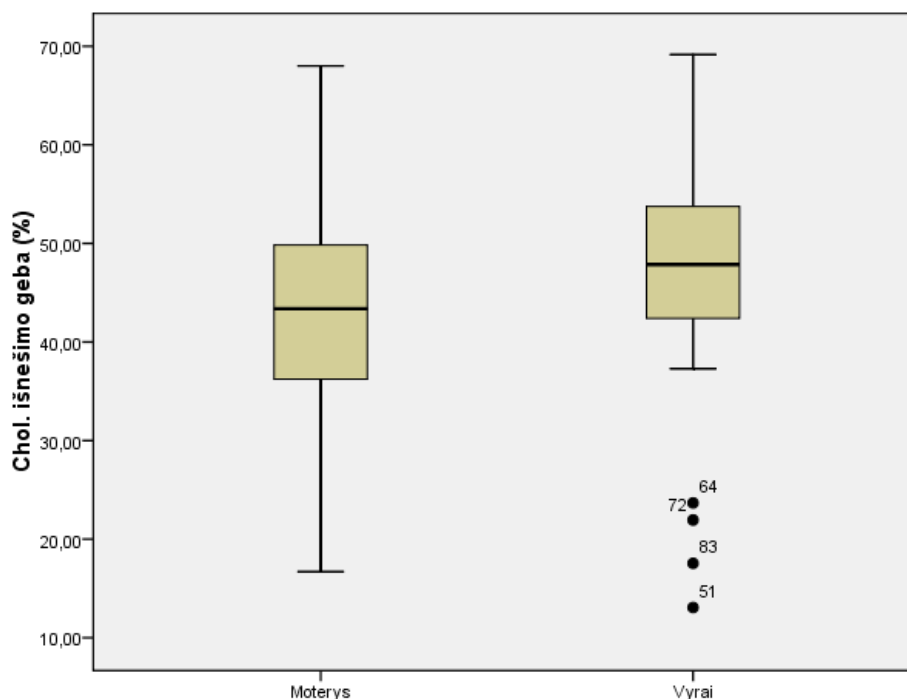
Rodiklis	Cholesterolio išnešimo geba (%)	
	r koreliacijos koeficientas	p reikšmė
Tiriamieji (N=95)		
Apo AI, g/L	-0,02	0,88
Apo B, g/L	-0,01	0,98
Apo AII, g/L	-0,07	0,63
Apo E, g/L	0,12	0,44
Apo B/Apo AI, g/L	-0,07	0,64
Lp a, g/L	0,11	0,47

3.6. Cholesterolio išnešimo gebos palyginimas tarp moterų ir vyrų

Buvo apskaičiuota cholesterolio išnešimo geba tarp moterų ir vyrų (5 pav.). Cholesterolio išnešimo geba tarp lyčių nesiskyrė ($p=0,14$) (14 lentelė).

14 lentelė. Cholesterolio išnešimo geba tarp moterų ir vyrų.

	Rodikliai	Vidurkis \pm SD	p reikšmė
Cholesterolio išnešimo geba (%)	Moterys	43,42 \pm 11,14)	0,14
	Vyrai	46,84 \pm 11,34)	



5 pav. Cholesterolio išnešimo geba tarp moterų ir vyrų.

Taip pat palygintas bendras cholesterolis ir lipidų apykaitos rodikliai tarp moterų ir vyrų (16 - 17 lentelė). Moterims buvo nustatyta statistiškai reikšmingai didesnė B – Ch ($p=0,04$), DTL – Ch ($p<0,01$) ir Apo AI ($p<0,01$) ir Apo E koncentracija ($p=0,04$) (15 – 16 lentelė).

15 lentelė. Pagrindiniai lipidų apykaitos rodikliai tarp vyrų ir moterų.

	Moterys	Vyrai	
Rodikliai	Mediana (Q ₃ – Q ₂)	Mediana (Q ₃ – Q ₂)	p reikšmė
B – Ch, mmol/L	5,69 (8,48 – 4,96)	5,2 (7,22 – 4,36)	0,04
TAG, mmol/L	1,14 (1,98 – 0,85)	1,23 (1,99 – 0,82)	0,74
DTL – Ch, mmol/L	1,5 (1,67 – 1,28)	1,11 (1,36 – 1,01)	<0,01
MTL – Ch, mmol/L	3,3 (5,9 – 2,8)	3,07 (5,1 – 2,58)	0,1

16 lentelė. Apolipoproteinų apykaitos rodikliai tarp moterų ir vyrų.

	Moterys	Vyrai	
Rodikliai	Mediana (Q ₃ – Q ₂)	Mediana (Q ₃ – Q ₂)	p reikšmė
Apo AI, g/L	1,84 (2,04 – 1,61)	1,59 (1,71 – 1,46)	<0,01
Apo B, g/L	0,95 (1,65 – 0,75)	0,89 (1,28 – 0,71)	0,12
Apo AII, g/L	0,35 (0,38 – 0,31)	0,33 (0,35 – 0,3)	0,09
Apo E, g/L	55 (69,5 – 42,5)	46 (65 – 34)	0,04
Apo B/Apo AI, g/L	0,53 (0,92 – 0,41)	0,55 (0,82 – 0,47)	0,73
Lp a, g/L	0,8 (0,28 – 0,03)	0,05 (2 – 0,03)	0,61

Siekiant įvertinti cholesterolio išnešimo gebos ir bendrojo cholesterolio koncentracijos bei lipidų apykaitos rodiklių tarpusavio ryšį buvo apskaičiuotas Spirmano koreliacijos koeficientas, kuris parodė, kad nėra ryšio tarp cholesterolio išnešimo gebos ir lipidų apykaitos rodiklių nei moterų, nei vyrų grupėje (17 – 20 lentelė).

17 lentelė. Moterų cholesterolio išnešimo gebos ir lipidų apykaitos ryšys.

Rodiklis	Cholesterolio išnešimo geba (%)	
	r koreliacijos koeficientas	p reikšmė
Tiriamieji (N=48)		
B – Ch, mmol/L	–0,2	0,17
TAG, mmol/L	–0,1	0,52
DTL – Ch, mmol/L	0,12	0,42
MTL – Ch mmol/L	–0,16	0,29

18 lentelė. Moterų cholesterolio išnešimo gebos ir apolipoproteinų ryšys.

Rodiklis	Cholesterolio išnešimo geba (%)	
	r koreliacijos koeficientas	p reikšmė
Tiriamieji (N=48)		
Apo AI, g/L	0,16	0,27
Apo B, g/L	–0,22	0,13
Apo AII, g/L	0,06	0,69
Apo E, g/L	–0,09	0,53
Apo B/Apo AI, g/L	–0,28	0,05
Lp a, g/L	–0,03	0,84

19 lentelė. Vyrų cholesterolio išnešimo gebos ir lipidų apykaitos ryšys.

Rodiklis	Cholesterolio išnešimo geba (%)	
	r koreliacijos koeficientas	p reikšmė
Tiriamieji (N=47)		
B – Ch, mmol/L	0,13	0,38
TAG, mmol/L	0,09	0,55
DTL – Ch, mmol/L	–0,1	0,49
MTL – Ch mmol/L	0,14	0,35

20 lentelė. Vyrų cholesterolio išnešimo gebos ir apolipoproteinų ryšys.

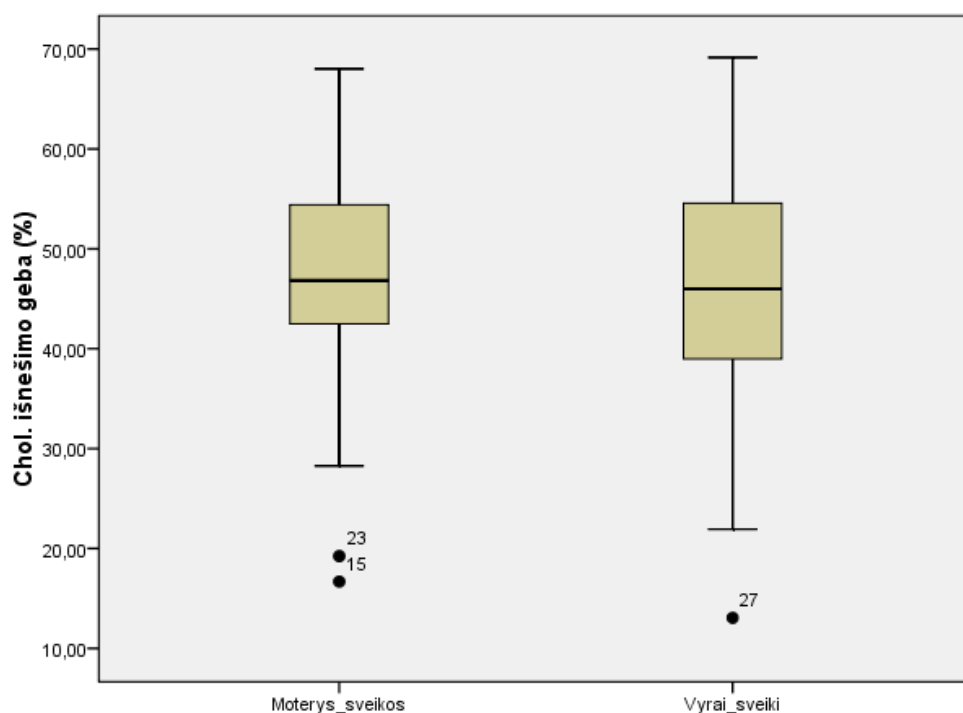
Rodiklis	Cholesterolio išnešimo geba (%)	
	r koreliacijos koeficientas	p reikšmė
Tiriamieji (N=47)		
Apo AI, g/L	0,04	0,81
Apo B, g/L	0,13	0,38
Apo AII, g/L	0,11	0,48
Apo E, g/LUS	–0,09	0,53
Apo B/Apo AI, g/L	0,12	0,43
Lp a, g/L	0,01	0,98

3.6.1. Cholesterolio išnešimo geba tarp sveikų moterų ir vyrų.

Cholesterolio išnešimo geba tarp sveikų moterų ir sveikų vyrų nesiskyrė ($p=0,81$) (21 lentelė). Tai rodo ir stačiakampė diagrama (6 pav.).

21 lentelė. Cholesterolio išnešimo geba tarp sveikų moterų ir sveikų vyrų.

	Rodikliai	Vidurkis \pm SD	p reikšmė
Cholesterolio išnešimo geba (%)	Moterys_sveikos	46,7 \pm 12,64)	0,81
	Vyrai_sveiki	45,81 \pm 13,5)	



6 pav. Cholesterolio išnešimo geba tarp sveikų moterų ir vyrų.

Tarp sveikų moterų ir vyrų statistiškai reikšmingai skyrėsi keli lipidų apykaitos rodikliai DTL – Ch ($p=0,02$), Apo AI ($p<0,01$), Apo E ($p=0,02$) (22 – 23 lentelė).

22 lentelė. Bendras cholesterolis ir lipidų apykaitos rodikliai tarp sveikų moterų ir vyrų.

	Sveikos moterys	Sveiki vyrai	
Rodikliai	Mediana ($Q_3 - Q_2$)	Mediana ($Q_3 - Q_2$)	p reikšmė
B - Ch, mmol/L	4,98 (5,23 – 4,45)	5,2 (7,22 – 4,36)	0,06
TAG, mmol/L	0,96 (1,08 – 0,71)	1,23 (1,99 – 0,82)	0,87
DTL - Ch, mmol/L	1,59 (1,87 – 1,32)	1,11 (1,36 – 1,01)	0,02
MTL - Ch, mmol/L	2,84 (3,23 – 2,5)	3,07 (5,1 – 2,58)	0,48

23 lentelė. Apolipoproteinų apykaitos rodikliai tarp sveikų moterų ir vyrų.

	Moterys	Vyrai	
Rodikliai	Mediana ($Q_3 - Q_2$)	Mediana ($Q_3 - Q_2$)	p reikšmė
Apo AI, g/L	1,19 (2,1 – 1,69)	1,59 (1,71 – 1,46)	<0,01
Apo B, g/L	0,78 (0,87 – 0,71)	0,89 (1,28 – 0,71)	0,26
Apo AII, g/L	0,33 (0,35 – 0,3)	0,33 (0,35 – 0,3)	0,82
Apo E, g/L	48,5 (58,75 – 40,25)	46 (65 – 34)	0,02
Apo B/Apo AI, g/L	0,42 (0,49 – 0,35)	0,55 (0,82 – 0,47)	0,06
Lp a, g/L	0,04 (0,12 – 0,02)	0,05 (2 – 0,03)	0,92

Siekiant įvertinti cholesterolio išnešimo gebos ir lipidų apykaitos rodiklių tarpusavio ryšį buvo apskaičiuotas Spirmano koreliacijos koeficientas. Cholesterolio išnešimo geba tarp sveikų moterų neturėjo sąsajos su lipidų apykaitos rodikliais (24 – 27 lentelė).

24 lentelė. Cholesterolio išnešimo gebos ir lipidų apykaitos ryšys tarp sveikų moterų.

Rodiklis	Cholesterolio išnešimo geba (%)	
	r koreliacijos koeficientas	p reikšmė
Tiriamieji (N=24)		
B – Ch, mmol/L	0,22	0,3
TAG, mmol/L	0,21	0,33
DTL – Ch, mmol/L	0,09	0,69
MTL – Ch mmol/L	0,28	0,18

25 lentelė. Cholesterolio išnešimo gebos ir apolipoproteinų ryšys tarp sveikų moterų.

Rodiklis	Cholesterolio išnešimo geba (%)	
	r koreliacijos koeficientas	p reikšmė
Tiriamieji (N=24)		
Apo AI, g/L	-0,06	0,8
Apo B, g/L	0,32	0,13
Apo AII, g/L	0,34	0,11
Apo E, g/L	-0,02	0,92
Apo B/Apo AI, g/L	0,23	0,29
Lp a, g/L	-0,07	0,75

26 lentelė. Cholesterolio išnešimo gebos ir lipidų apykaitos ryšys tarp sveikų vyrų.

Rodiklis	Cholesterolio išnešimo geba (%)	
	r koreliacijos koeficientas	p reikšmė
Tiriamieji (N=24)		
B – Ch, mmol/L	-0,15	0,5
TAG, mmol/L	-0,11	0,62
DTL – Ch, mmol/L	-0,15	0,5
MTL – Ch mmol/L	-0,07	0,74

Sveikų vyrų grupėje aptiktas ryšys tarp cholesterolio išnešimo gebos ir Apo E ($r = -0,46$; $p = 0,02$) (28 lentelė).

27 lentelė. Cholesterolio išnešimo gebos ir apolipoproteinų ryšys tarp sveikų vyrų.

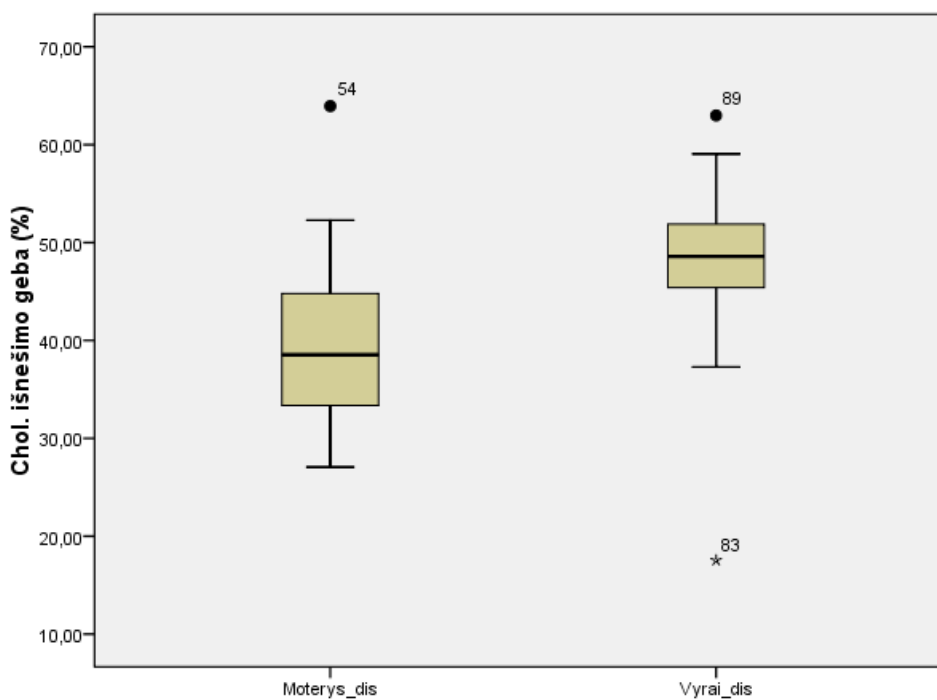
Rodiklis	Cholesterolio išnešimo geba (%)	
	r koreliacijos koeficientas	p reikšmė
Tiriamieji (N=24)		
Apo AI, g/L	-0,02	0,92
Apo B, g/L	-0,12	0,57
Apo AII, g/L	0,01	0,97
Apo E, g/L	-0,46*	0,02
Apo B/Apo AI, g/L	-0,09	0,67
Lp a, g/L	-0,1	0,65

3.6.2. Cholesterolio išnešimo geba tarp dislipidemija sergančių moterų ir vyrų.

Taip pat buvo palyginta cholesterolio išnešimo geba tarp sergančių dislipidemija moterų ir sergančių vyrų (7 pav.). Buvo aptiktas statistiškai reikšmingas skirtumas ($p < 0,01$) (28 lentelė).

28 lentelė. Cholesterolio išnešimo geba tarp sergančių dislipidemija moterų ir sergančių vyrų.

	Pacientai	Vidurkis \pm SD	p reikšmė
Chol. išnešimo geba (%)	Moterys_dis	40,14 \pm 8,44	<0,01
	Vyrai_dis	47,92 \pm 8,73	



7 pav. Cholesterolio išnešimo geba tarp sergančių dislipidemija moterų ir vyrų.

Tarp sergančių moterų ir vyrų statistiškai reikšmingai skyrėsi keletas lipidų apykaitos rodiklių (29 – 30 lentelė).

29 lentelė. Bendras cholesterolis ir lipidų apykaitos rodikliai tarp sergančių moterų ir vyrų.

	Sergančios moterys	Sergantys vyrai	
Rodikliai	Mediana (Q ₃ – Q ₂)	Mediana (Q ₃ – Q ₂)	p reikšmė
B – Ch, mmol/L	8,47 (9,5 – 7,1)	7,22 (8,1 – 5,57)	0,03
TAG, mmol/L	1,97 (2,48 – 1,35)	1,85 (2,98 – 1,29)	0,83
DTL – Ch, mmol/L	1,42 (1,58 – 1,17)	1,05 (1,35 – 0,78)	<0,01
MTL – Ch, mmol/L	5,89 (7,12 – 4,38)	5,1 (5,71 – 2,95)	0,03

30 lentelė. Apolipoproteinų apykaitos rodikliai tarp sergančių dislipidemija moterų ir vyrų.

	Moterys	Vyrai	
Rodikliai	Mediana (Q ₃ – Q ₂)	Mediana (Q ₃ – Q ₂)	p reikšmė
Apo AI, g/L	1,75 (1,95 – 1,53)	1,57 (1,68 – 1,45)	0,03
Apo B, g/L	1,64 (1,74 – 1,3)	1,28 (1,64 – 0,99)	0,04
Apo AII, g/L	0,37 (0,41 – 0,31)	0,33 (0,35 – 0,31)	0,02
Apo E, g/L	69 (89,5 – 53)	64 (88 – 41)	0,41
Apo B/Apo AI, g/L	0,92 (1,1 – 0,77)	0,82 (0,95 – 0,68)	0,33
Lp a, g/L	0,12 (0,42 – 0,06)	0,12 (0,28 – 0,04)	0,38

Siekiant įvertinti cholesterolio išnešimo gebos ir lipidų apykaitos rodiklių tarpusavio ryšį tarp sergančių moterų ir vyrų buvo apskaičiuotas Spirmano koreliacijos koeficientas. Neaptikta sąsaja tarp cholesterolio išnešimo gebos ir lipidų apykaitos rodiklių (31 – 3 4 lentelė).

31 lentelė. Cholesterolio išnešimo gebos ir lipidų apykaitos ryšys tarp sergančių moterų.

Rodiklis	Cholesterolio išnešimo geba (%)	
	r koreliacijos koeficientas	p reikšmė
Tiriamieji (N=24)		
B – Ch, mmol/L	0,16	0,47
TAG, mmol/L	0,17	0,43
DTL – Ch, mmol/L	–0,19	0,37
MTL – Ch mmol/L	0,13	0,55

32 lentelė. Cholesterolio išnešimo gebos ir apolipoproteinų ryšys tarp sergančių moterų.

Rodiklis	Cholesterolio išnešimo geba (%)	
	r koreliacijos koeficientas	p reikšmė
Tiriamieji (N=24)		
Apo AI, g/L	0,23	0,29
Apo B, g/L	0,03	0,9
Apo AII, g/L	0,03	0,89
Apo E, g/L	0,31	0,14
Apo B/Apo AI, g/L	–0,11	0,63
Lp a, g/L	0,36	0,09

33 lentelė. Cholesterolio išnešimo gebos ir lipidų apykaitos ryšys tarp sergančių vyrų.

Rodiklis	Cholesterolio išnešimo geba (%)	
	r koreliacijos koeficientas	p reikšmė
Tiriamieji (N=23)		
B – Ch, mmol/L	0,09	0,69
TAG, mmol/L	0,1	0,65
DTL – Ch, mmol/L	-0,15	0,5
MTL – Ch mmol/L	0,08	0,71

34 lentelė. Cholesterolio išnešimo gebos ir apolipoproteinų ryšys tarp sergančių vyrų.

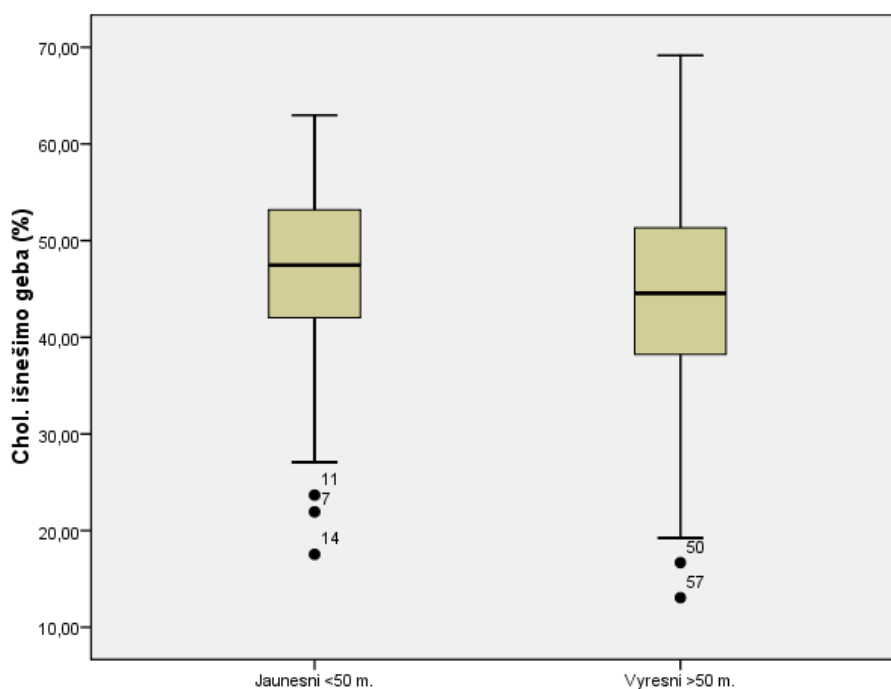
Rodiklis	Cholesterolio išnešimo geba (%)	
	r koreliacijos koeficientas	p reikšmė
Tiriamieji (N=23)		
Apo AI, g/L	0,02	0,91
Apo B, g/L	0,15	0,49
Apo AII, g/L	0,19	0,39
Apo E, g/L	0,07	0,75
Apo B/Apo AI, g/L	0,13	0,54
Lp a, g/L	-0,16	0,46

3.7. Cholesterolio išnešimo geba ir amžius

Tyrimo metu buvo patikrinta ar cholesterolio išnešimo geba priklauso nuo amžiaus. Buvo dvi grupės – jaunesni (<50 m.) ir vyresni (>50 m.), statistiškai reikšmingo skirtumo tarp cholesterolio išnešimo gebos ir amžiaus neaptikta ($p=0,46$) (35 lentelė). Tai atvaizduoja ir stačiakampė diagrama (8 pav.).

35 lentelė. Cholesterolio išnešimo geba pagal amžių.

	Pacientai	Vidurkis \pm SD	p reikšmė
Chol. išnešimo geba (%)	Jaunesni (<50 m.)	46,11 \pm 10,61	0,46
	Vyresni (>50 m.)	44,39 \pm 11,84	



8 pav. Cholesterolio išnešimo geba pagal amžių.

Tarp amžiaus grupių buvo tikrinta ar skiriasi lipidų apykaitos rodikliai (36 – 37 lentelė). Statistiškai reikšmingai skyrėsi tik keli lipidų apykaitos rodikliai Apo AI ($p=0,01$) ir Apo E ($p=0,01$) (37 lentelė). Abiejų apolipoproteinų koncentracija buvo didesnė vyresnių pacientų grupėje (>50 m.).

36 lentelė Bendras cholesterolis ir lipidų apykaitos rodikliai pagal amžių.

	Jaunesni (<50 m.)	Vyresni (>50 m.)	
Rodikliai	Mediana ($Q_3 - Q_2$)	Mediana ($Q_3 - Q_2$)	p reikšmė
B – Ch, mmol/L	5,2 (7,42 – 4,39)	5,69 (8,01 – 4,94)	0,1
TAG, mmol/L	1,16 (1,77 – 0,7)	1,25 (2,02 – 1,01)	0,09
DTL – Ch, mmol/L	1,27 (1,51 – 1,04)	1,4 (1,58 – 1,17)	0,1
MTL – Ch, mmol/L	3,09 (4,48 – 2,66)	3,64 (5,82 – 2,77)	0,3

37 lentelė. Apolipoproteinų apykaitos rodikliai pagal amžių.

	Jaunesni (<50 m.)	Vyresni (>50 m.)	
Rodikliai	Mediana ($Q_3 - Q_2$)	Mediana ($Q_3 - Q_2$)	p reikšmė
Apo AI, g/L	1,64 (1,85 – 1,46)	1,8 (1,96 – 1,56)	0,01
Apo B, g/L	0,89 (1,34 – 0,75)	1 (1,61 – 0,72)	0,54
Apo AII, g/L	0,33 (0,36 – 0,3)	0,34 (0,37 – 0,31)	0,23
Apo E, g/L	42 (64,5 – 34,5)	57,5 (70,5 – 46,75)	0,01
Apo B/Apo AI, g/L	0,55 (0,84 – 0,47)	0,53 (0,89 – 0,41)	0,63
Lp a, g/L	0,08 (0,28 – 0,03)	0,07 (0,14 – 0,03)	0,36

Siekiant įvertinti cholesterolio išnešimo gebos ir lipidų apykaitos rodiklių tarpusavio ryšį buvo apskaičiuotas Spirmano koreliacijos koeficientas. Tarp jaunesnių (<50 m.) pacientų cholesterolio išnešimo geba turėjo stiprų neigiamą ryšį su MTL – Ch ($r = -0,41$; $p < 0,01$) ir Apo B/Apo AI ($r = -0,44$; $p < 0,01$), vidutinis neigiamas ryšys aptiktas su Apo B ($r = -0,39$; $p = 0,01$) ir Lp a ($r = -0,53$; $p = 0,03$) (38 – 40 lentelė).

38 lentelė. Cholesterolio išnešimo gebos ir lipidų apykaitos ryšys tarp jaunesnių (<50 m) pacientų.

Rodiklis	Cholesterolio išnešimo geba (%)	
	r koreliacijos koeficientas	p reikšmė
Tiriamieji (N=40)		
B – Ch, mmol/L	-0,31	0,06
TAG, mmol/L	-0,09	0,57
DTL – Ch, mmol/L	-0,21	0,2
MTL – Ch mmol/L	-0,41**	<0,01

39 lentelė. Cholesterolio išnešimo gebos ir apolipoproteinų ryšys tarp tarp jaunesnių (<50 m) pacientų.

Rodiklis	Cholesterolio išnešimo geba (%)	
	r koreliacijos koeficientas	p reikšmė
Tiriamieji (N=40)		
Apo AI, g/L	0,11	0,5
Apo B, g/L	-0,39*	0,01
Apo AII, g/L	-0,03	0,87
Apo E, g/L	-0,14	0,39
Apo B/Apo AI, g/L	-0,44**	<0,01
Lp a, g/L	-0,53*	0,03

Apskaičiavus Spirmano koreliacijos koeficientą vyresnio amžiaus pacientams (>50 m.) ryšys tarp cholesterolio išnešimo gebos ir lipidų apykaitos rodiklių neaptiktas (40 – 41 lentelė).

40 lentelė. Cholesterolio išnešimo gebos ir lipidų apykaitos ryšys tarp vyresnių (>50 m) pacientų.

Rodiklis	Cholesterolio išnešimo geba (%)	
	r koreliacijos koeficientas	p reikšmė
Tiriamieji (N=55)		
B – Ch, mmol/L	0,1	0,46
TAG, mmol/L	0,06	0,66
DTL – Ch, mmol/L	0,05	0,7
MTL – Ch mmol/L	0,16	0,24

41 lentelė. Cholesterolio išnešimo gebos ir apolipoproteinų ryšys tarp tarp vyesnių (>50 m) pacientų.

Rodiklis	Cholesterolio išnešimo geba (%)	
	r koreliacijos koeficientas	p reikšmė
Tiriamieji (N=55)		
Apo AI, g/L	-0,02	0,89
Apo B, g/L	0,12	0,38
Apo AII, g/L	0,1	0,46
Apo E, g/L	-0,1	0,46
Apo B/Apo AI, g/L	0,08	0,55
Lp a, g/L	0,13	0,35

REZULTATŲ APTARIMAS

Europoje kasmet miršta apie 3,9 mln žmonių ir tai sudaro 45 % visų mirčių Europoje [20; 29]. Epidemiologiniai tyrimai daug metų teigė, kad didelio tankio lipoproteinų cholesterolio koncentracija kraujyje atvirkščiai susijusi su širdies ir kraujagyslių ligų rizika [18]. Tačiau vėliau atlikti tyrimai parodė, kad didinant DTL – Ch koncentraciją kraujyje klinikinė nauda negaunama [34]. Tai paskatino atkreipti dėmesį ne į DTL – Ch koncentraciją, o į DTL atliekamas funkcijas, konkrečiai į cholesterolio išnešimo gebą. Cholesterolio išnešimo geba - tai didelio tankio lipoproteinų gebėjimas paimti cholesterolį iš makrofagų ir taip palengvinti grįžtamąjį cholesterolio transportą [17]. Mes savo darbe darbe siekėme nustatyti didelio tankio lipoproteinų cholesterolio išnešimo gebą sveikiems asmenims ir kardiovaskulinės rizikos pacientams. Tyrimo metu nustatėme kad pacientų (n=95) vidutinė DTL cholesterolio išnešimo geba (45,11%). Kitų autorių atliktų DTL cholesterolio išnešimo gebos tyrimų rezultatai yra panašūs: (41,7%), (39,5%), (37,1%) [3, 50]. Palyginus mūsų rezultatus su kitose šalyse gautais rezultatais matyti, tyrimo metu gauti rezultatai kiek didesni. Tačiau daugelis tyrimų skaičiuoja DTL cholesterolio išnešimo gebos koncentraciją, o ne procentinį išnešto cholesterolio kiekį serume.

DTL cholesterolio išnešimo gebos ir lipidų apykaitos rodiklių ryšys. Dislipidemija yra seniai pripažįstamas kaip vienas iš svarbiausių širdies ir kraujagyslių ligų rizikos veiksnių [46]. Padidėjusi B – Ch, TAG, MTL – Ch ir sumažėjusi DTL – Ch koncentracija lemia aterosklerozės vystymąsi, arterijų spindžio susiaurėjimą ir to pasekoje išsivysčiusias komplikacijas tokias kaip MI, insultas ir kt. DTL pagrindinė funkcija yra grįžtamasis cholesterolio transportas, jie perneša cholesterolį iš audinių į kepenis [26]. Taigi DTL pasižymi antiaterogeninėmis savybėmis. Mūsų tyrimo metu nustatėme, kad DTL cholesterolio išnešimo geba turi neigiamą ryšį su DTL – Ch dislipidemija sergantiems asmenims. Jaunesnių pacientų (<50 m.) grupėje cholesterolio išnešimo geba turėjo neigiamą ryšį su MTL – Ch, silpną neigiamą ryšį su Apo E, Apo B/Apo AI ir Lp a. Literatūros duomenimis cholesterolio išnešimo geba turi teigiamą ryšį su DTL – Ch ir Apo AI [10, 18, 44]. Tačiau tai nereiškia, kad padidėjusi šių rodiklių koncentracija kraujyje visada didina DTL cholesterolio išnešimo gebą [49].

Didelio tankio lipoproteinų cholesterolio išnešimo geba tarp sveikų ir dislipidemija sergančių pacientų. Sergant dislipidemija aptinkami lipidų pokyčiai kraujyje. Sergančių dislipidemija pacientų kraujyje didėja MTL – Ch, TAG ir mažėja DTL – Ch koncentracija [29]. Sveikų pacientų DTL cholesterolio išnešimo geba ($46,25 \pm 12,94\%$), sergančiųjų dislipidemija ($43,95 \pm 9,35\%$), $p=0,32$. Sergančių dislipidemija pacientų cholesterolio išnešimo geba turėjo

neigiamą ryšį su DTL – Ch ($r = -0,33$; $p = 0,03$). Sergančių dislipidemija pacientų DTL – Ch koncentracija buvo mažesnė nei sveikų pacientų ($p = 0,03$). Literatūros duomenimis cholesterolio išnešimo geba turi teigiamą ryšį su DTL – Ch [10, 44]. L. Nitschke su kolegomis atliktas tyrimas parodė, kad sveikų pacientų cholesterolio išnešimo geba (51%), sergančių širdies ir kraujagyslių ligomis (46%) ir aptiktas statistiškai reikšmingas skirtumas ($p = 0,03$) [39]. Tą patį įrodė D. Saleheen ir kt., kad cholesterolio išnešimo geba atvirkščiai susijusi su širdies ir kraujagyslių ligomis nepriklausomai nuo amžiaus, lyties ir kt. [44]. Tačiau yra darbų, kurie paneigia cholesterolio išnešimo gebos ir širdies bei kraujagyslių ligų tarpusavio ryšį. Dalaso širdies tyrime A. Rohatgi su kolegomis nustatė, kad nėra ryšio tarp cholesterolio išnešimo gebos ir aterosklerozės įvykių (infarkto, insulto, mirties nuo širdies ritmo sutrikimų ir kt.) [41].

Didelio tankio lipoproteinų cholesterolio išnešimo geba tarp moterų ir vyrų. Tarp vyrų ir moterų statistiškai reikšmingai skyrėsi keletas lipidų apykaitos rodiklių. Visi lipidų apykaitos rodikliai buvo didesni pas moteris. Moterų DTL cholesterolio išnešimo geba buvo ($43,42 \pm 11,14\%$), vyrų ($46,84 \pm 11,34\%$), ($p = 0,14$). Gauti duomenys sutapo su literatūros pateiktais duomenimis, kad DTL cholesterolio išnešimo geba tarp vyrų ir moterų statistiškai reikšmingai nesiskiria [4]. Tačiau kitame šaltinyje minima, kad moterims iki menopauzės DTL cholesterolio išnešimo geba didesnė nei vyrų nepriklausomai nuo DTL – Ch koncentracijos. Tame pačiame straipsnyje minima, kad moterims iki menopauzės dažniausiai ir būna didesnė DTL – Ch koncentracija [49].

Taip pat buvo lygintos sveikos moterys ir sveiki vyrai, bei dislipidemija sergančios moterys ir dislipidemija sergantys vyrai. Lyginant lipidų apykaitos rodiklius tarp lyčių skyrėsi DTL – Ch, Apo AI ir Apo E. Sveikų moterų grupėje buvo didesnė DTL – Ch ir Apo E, sveikų vyrų Apo AI. Sveikų moterų DTL cholesterolio išnešimo geba ($46,7 \pm 12,64\%$), vyrų ($45,81 \pm 13,5\%$), ($p = 0,81$). Sveikų vyrų grupėje aptiktas neigiamas ryšys tarp DTL cholesterolio išnešimo gebos ir Apo E ($r = -0,46$; $p = 0,02$). Apolipoproteinas E kaip ir Apo AI vaidina svarbų vaidmenį grįžtamajame cholesterolio transporte. Pagrindinė funkcija palengvinti cholesterolio išnešimą iš makrofagų ir kepenyse jį atiduoti kepenims [42]. Lyginant sergančias dislipidemija moteris ir sergančius vyrus, tarp grupių skyrėsi keletas lipidų apykaitos rodiklių. Moterų sergančių dislipidemija cholesterolio išnešimo geba ($40,14 \pm 8,44\%$), o vyrų ($47,92 \pm 8,73\%$), ($p < 0,01$). Keletas lipidų apykaitos rodiklių skyrėsi tarp sergančių dislipidemija moterų ir vyrų, bet neturėjo sąsajos su cholesterolio išnešimo geba.

Didelio tankio lipoproteinų išnešimo geba ir amžius. Dislipidemija yra laikoma viena iš pagrindinių kardiovaskulinės rizikos veiksnių pagyvenusiems žmonėms, tačiau naujausiais duomenimis dislipidemija vis daugiau pasireiškia vidutinio amžiaus asmenims [46]. Su

amžiumi didėja B – Ch, MTL – Ch, mažėja DTL - Ch koncentracija kraujyje ir būtent šie rodikliai didina kardiovaskulinių ligų išsivystymo riziką. Tyrime dalyvavo 44 jaunesnių (<50 m.) ir 50 vyresnių (>50 m.) tiriamųjų. Jaunesnių pacientų DTL cholesterolio išnešimo geba ($46,11 \pm 10,61\%$), o vyresnių ($44,39 \pm 11,84\%$), ($p=0,46$). Jaunesnių pacientų DTL cholesterolio išnešimo geba turėjo neigiamą ryšį su MTL – Ch ($r= - 0,41$; $p<0,01$), Apo B ($r= - 0,39$; $p=0,01$), Apo B/Apo AI ($r= - 0,44$; $p<0,01$), o vyresnių tiriamųjų grupėje ryšys DTL cholesterolio išnešimo gebos ir lipidų apykaitos rodiklių neaptiktas. Literatūros duomenimis cholesterolio išnešimo geba tarp jaunų ir vyresnių pacientų statistiškai reikšmingai skiriasi, tai nustatė H. Berrougui su kolegomis. Jaunesnių pacientų cholesterolio išnešimo geba (49,06%), vyresnių (41,76%), aptikta statistiškai reikšmingai didesnė jaunesnių pacientų cholesterolio išnešimo geba ($p=0,01$) [3].

Mūsų darbe nustatėme, kad cholesterolio išnešimo geba tarp sveikų ir dislipidemija sergančių pacientų nesiskiria. Statistiškai reikšmingas skirtumas aptiktas tik tarp sergančių moterų ir vyrų. Literatūros duomenimis dažniausiai cholesterolio išnešimo geba turi atvirkštinį ryšį su širdies ir kraujagyslių ligomis todėl šis tyrimas itin svarbus ateityje. Atliekant tokius tyrimus kaip mūsų reikėtų didinti tiriamųjų imtį, bei tyrimą atlikti ne su „Biovision“ rinkiniu bet su savo reagentais. Labai svarbu DTL cholesterolio išnešimo gebos metodą standartizuoti ir taikyti šį žymenį ateityje vertinant formuojantis aterosklerozinei plokštei ir gydymo efektyvumui stebėti.

IŠVADOS

1. DTL cholesterolio išnešimo geba buvo atvirkščiai susijusi su didelio tankio lipoproteinų koncentracija ($r = -0,33$; $p = 0,03$) dislipidemija sergančių pacientų grupėje. Sveikų vyrų grupėje cholesterolio išnešimo geba buvo atvirkščiai susijusi su Apo E ($r = -0,46$; $p = 0,02$).
2. Cholesterolio išnešimo geba sveikų pacientų ir dislipidemija sergančių nesiskyrė (46,25% ir 43,95%, $p = 0,32$).
3. Cholesterolio išnešimo geba statistiškai reikšmingai skyrėsi tik tarp dislipidemija sergančių moterų (40,14%) ir sergančių vyrų (47,92%), ($p < 0,01$).

SUMMARY

High Density Lipoprotein Cholesterol Efflux Capacity in High Cardiovascular Risk Patients

Introduction. Cholesterol efflux capacity is the process by which high-density lipoproteins (HDLs) can take cholesterol from macrophages and transfer them to the liver where cholesterol is removed from body thru bile. HDL cholesterol removal facilitates reverse cholesterol transport. By standardizing this method, it can be used as a clinical trial for cardiovascular disease and monitoring the effectiveness of treatment.

The aim of the study was to evaluate the capacity of high density lipoprotein cholesterol to be administered to healthy and cardiovascular risk patients.

Methods. The study included 95 patients aged from 27 to 60 years. Sample of people were divided into healthy and sickly dyslipidaemia, also by gender as women and men. Sample had a total cholesterol and other lipid metabolism rates. The fluorescence intensity of HDL cholesterol efflux capacity was measured by a spectrophotometer and the cholesterol efflux capacity was calculated according to the formula for all patients.

Results. Cholesterol efflux capacity in healthy patients (46,25%), in patients with dyslipidaemia (43,95%), ($p=0,32$). Weak negative association between cholesterol efflux capacity and HDL – Ch ($r= - 0,33$; $p=0,03$) was found in sick patients group. Women's cholesterol capacity (43,42%), men (46,84%), ($p=0,14$). There is no relationship between the cholesterol efflux capacity and the lipid metabolism rates. Cholesterol efflux capacity between healthy women (46,7%) and men (45,81%), ($p=0,81$). In the healthy male group, a weakly negative association was found between the cholesterol efflux capacity and Apo E ($r= - 0,46$; $p=0,02$). There is statistically significant difference ($p<0,01$) in the cholesterol efflux capacity between (40,14%) women with dyslipidemia and (47,92%) men with dyslipidemia, statistically significant scores were detected ($p<0,01$). Cholesterol efflux capacity younger patients (46,11%), older (44,39%), ($p=0,46$). The HDL cholesterol efflux capacity of younger patients had a negative correlation with HDL – Ch ($r= - 0,41$; $p<0,01$), Apo B ($r= - 0,39$; $p=0,01$), Apo B/Apo AI ($r= - 0,44$; $p<0,01$).

Conclusions. HDL cholesterol efflux capacity in dyslipidemia patients had weak negative correlation with HDL – Ch ($r= - 0,33$; $p=0,03$). Cholesterol efflux capacity in the healthy male group had weak negative correlation with Apo E ($r= - 0,46$; $p=0,02$). Cholesterol efflux capacity had statistically significant differences only between woman with dyslipidemia

(40,14%) and man with dyslipidemia (47,92%) ($p < 0,01$), it was higher in man with dyslipidemia than in woman with dyslipidemia. Cholesterol efflux capacity in healthy patients group was (46,25%) and (43,95%) in dyslipidemia patients. No statistically significant differences found between healthy and dyslipidemia patients ($p = 0.32$).

Key words. Cholesterol removal capacity, high density lipoproteins, atherosclerosis, dyslipidaemia, lipid metabolism rates.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju darbo vadovei doc., dr. Dovilei Karčiauskaitei už patarimus ir suteiktas žinias, pagalbą rašant magistro darbą. Taip pat noriu padėkoti Vytautui Žėkui už praktines žinias ir pagalbą atliekant eksperimentinę tyrimo dalį.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Annema W., Eckardstein A. High-Density Lipoproteins – multifunctional but vulnerable protections from atherosclerosis. *Circ J.* 2013; 77: 2432 – 48.
2. Bentzon J.F., Otsuka F., Virmani R., Falk E. Mechanisms of Plaque Formation and Rupture. *Circ. Res.* 2014; 114: 1852 – 66.
3. Berrougui H., Isabelle M., Cloutier M., Grenier G., Khalil A. Age – related impairment of HDL – mediated cholesterol efflux. *J Lipid Res.* 2007; 48 (2): 328 – 36.
4. Bhatt A., Rohatgi A. HDL Cholesterol Efflux Capacity: Cardiovascular Risk Factor and Potential Therapeutic Target. *Curr Atheroscler Rep.* 2016; 18 (2): 1 – 8.
5. Bioamponsem A.G., Bioamponsem L.K. The Role of Inflammation in Atherosclerosis. *Adv. Appl. Sci. Res.* 2011; 2(4):194 – 207.
6. Burtis C.A., Ashwood E.R., Bruns D.E. *Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics.* United State of America: Elsevier; 2012. 74356 p.
7. Burtis C.A., Bruns D.E. *Clinical chemistry and molecular diagnostics.* United State of America: Elsevier; 2015. 398 – 99 p.
8. Choi H.Y., Hafiane A., Schwertani A., Genest J. High – Density Lipoproteins: Biology, Epidemiology, and Clinical Management. *Canadian Journal of Cardiology.* 2017; 33 (3): 325 – 33.
9. Cuchel , M. , and D. J. Rader. Macrophage reverse cholesterol transport: Key to regression of atherosclerosis? *Circulation.* 2006; 113: 2548 – 2555.
10. Cuchel M., Llera-Moya M., Phillips J.A. Cholesterol efflux capacity of serum is better correlated with concentrations of APOA – I than HDL-C. *Journal of Clinical Lipidology.* 2008; 2: 7.
11. Delewi R., Yang H., Kastelein J. Atherosclerosis. *Cardiology org.* 2013: 21 – 56.
12. Doonan R.J, Hafiane A., Lai C., Veinot J.P., Genest J., Daskalopoulou S.S. Cholesterol Efflux Capacity, Carotid Atherosclerosis, and Cerebrovascular Symptomatology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014; 34 (4): 921 – 26.
13. Douglas G., Channon K.M. *The pathogenesis of atherosclerosis.* Elsevier. 2014; 42 (9): 480 – 84.
14. Eckardstein A., Kardassis D. *High density lipoproteins. European cooperation in science and technology: Springer; 2015. 183 – 84,198 – 99 p.*

15. Escolà-Gil J.C, Lee-Rueckert M., Santos D., Cedó L. , Blanco-Vaca F., Julve J. Quantification of In Vitro Macrophage Cholesterol Efflux and In Vivo Macrophage – Specific Reverse Cholesterol Transport. *Methods Mol Biol.* 2015: 211 – 32.
16. Garda H.A. Structure – function relationships in human apolipoprotein A – I: role of a central helix pair. *Future Lipidol.* 2007; 2 (1): 95 – 104.
17. Hafiane A., Genest J. HDL – Mediated Cellular Cholesterol Efflux Assay Method. *Ann Clin Lab Sci.* 2015: 45 (6); 659 – 68.
18. Hutchins P.M., Heinecke J.W. Cholesterol Efflux Capacity, Macrophage Reverse Cholesterol Transport, and Cardioprotective HDL. *Curr Opin Lipidol.* 2015; 26 (5): 388 – 93.
19. Internetinė prieda: <http://www.ehnheart.org/cvd-statistics/cvd-statistics-2017.html> [žiūrėta: 2017 – 09 – 12]
20. Internetinė prieda: http://ec.europa.eu/eurostat/statisticsexplained/index.php/Cardiovascular_diseases_statistics [žiūrėta: 2016 – 04 – 18]
21. Khera A.V., Cuchel M.L., Rodrigues A. et al. Cholesterol Efflux Capacity, High – Density Lipoprotein Function, and Atherosclerosis. *N Engl J Med.* 2011; 364 (2): 127 – 135.
22. Kingwell A., Chapman M.J., Kontush A., Miller N.A. HDL – targeted therapies: progress, failures and future. *Nat Rev Drug Discov.* 2014; 13 (6): 445 – 64.
23. Kuai R., Li D., Chen Y.E., Moon J.J., Schwendeman A. High-density lipoproteins: nature’s multifunctional nanoparticles. *ASC Nano.* 2016; 10 (3): 3015 – 41.
24. Kučinskienė Z.A. Klinikinės biochemijos ir laboratorinės diagnostikos pagrindai. Vilnius: Vilniaus universiteto I-kla; 2008. 246 – 48, 252, 257 p.
25. Libby P. History of Discovery: Inflammation in Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; 32 (9): 2045 – 51.
26. Libby P., Ridker P.M., Hansson G.K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 2011; 473 (7347): 317 – 325.
27. Mangaraj M., Nanda R., Panda S. Apolipoprotein A – I: A Molecule of Diverse Function. *Indian J Clin Biochem.* 2016; 31 (3): 253 – 59.
28. Mendez O.P., Pacheco H.G., Franco M. HDL – cholesterol in coronary artery disease risk: Function or structure? *Clin Chim Acta* 2014; 429: 115.
29. Miller M. Dyslipidemia and cardiovascular risk: the importance of early prevention. *QJM* 2009; 102 (9): 657 – 67.

30. Montrimaitė M., Petrikonytė D., Plikosova J., Karčiauskaitė D., Kučinskienė Z.A. Lipidų ir lipoproteinų tyrimai vertinant širdies ir kraujagyslių ligų riziką. *Laboratorinė medicina* 2015; 3 (67): 137 – 42.
31. Pherson R.A., Pincus M.R. *Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods*. Missouri: Elsevier 2017; 221 – 2 43 p.
32. Pirilloa A., Noratac G.D, Catapanob A.L. High-density lipoprotein subfractions—what the clinicians need to know. *Cardiology* 2013; 124 (2): 116 – 25.
33. Praškevičius A, Vieželiene D., Ivanovienė L., Stasiūnienė N., Kašauskas A., Rodovičius H., *et al.* Lipidų apykaitos patologijos biochemija. Kaunas: KMU leidykla 2007: 44 – 45, 60 – 64 p.
34. Qiu C., Zhao X., Zhou Q., Zhang Z. High – density lipoprotein cholesterol efflux capacity is inversely associated with cardiovascular risk: a systematic review and meta – analysis. *Lipids Health Dis.* 2017; 16 (1): 212
35. Rader D., Hovingh G.K. Lipids and cardiovascular disease. *Lancet* 2014; 384 (9943): 618 – 25.
36. Rafieian – Kopaei M., Setorki M., Douidi M., Baradaran A. Nasri H. Atherosclerosis: Process, Indicators, Risk Factors and New Hopes. *Int J of Prev Med.* 2014; 5(8): 927 – 46.
37. Remaley A.T. HDL cholesterol/HDL particle ratio: a new measure of HDL function? *J Am Coll Cardiol.* 2015; 65 (4): 364 – 66.
38. Rye K.A., Barter P.J. Cardioprotective functions of HDL. *J Lipid Res.* 2014; 55(2): 168 – 79.
39. Rohatgi A. High-density lipoprotein function measurement in human studies: focus on cholesterol efflux capacity. *Prog Cardiovasc Dis.* 2015; 58 (1): 32 – 40.
40. Rohatgi A., Grunday S.M. Cholesterol efflux capacity as a therapeutic target: rationale and clinical implications. *J Am Coll Cardiol.* 2015; 66 (20): 2211 – 13 p.
41. Rohatgi A., Khera A., Berry J.D., Givens E.G., Ayers C.R., Wedin K.E. *et al.* HDL cholesterol efflux capacity and incident cardiovascular events. *N Engl J Med.* 2014; 371 (25): 2383 – 93.
42. Rosenson R.S., Brewer H.B., Davidson W.S *et al.* Cholesterol Efflux and Atheroprotection Advancing the Concept of Reverse Cholesterol Transport. *Circulation* 2012; 125 (15): 1905 – 19.
43. Ross R. CELL BIOLOGY OF ATHEROSCLEROSIS. *Annu Rev Physiol.* 1995; (57) 791 – 804.

44. Seleheem D., Scott R., Javad S., Zhao W., Rodrigues A. Association of HDL cholesterol efflux capacity with incident coronary heart disease events: a prospective case – control study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2015; 3 (7): 507 – 13.
45. Sankaranarayanan S., Kellner-Weibel G., Llera – Moya M., Phillips M., Asztalos B.F., Bittman R., Rothblat G.H. A sensitive assay for ABCA1 – mediated cholesterol efflux using BODIPY – cholesterol. *The Journal of Lipid Research* 2011; 52: 2332 – 2340.
46. Shanmugasundaram M., Rough S.J, Alpert J.S. Dyslipidemia in the Elderly: Should it Be Treated? *Clin Cardiol.* 2010; 33 (1): 4 – 9.
47. Song Y.S., Lee S.H., Park B.H., Kim S.H., Hwang W.S. et al. Cholesterol efflux monitoring in macrophage form cells by using fluorescence lifetime imaging. *Bios* 2015: 1 – 7.
48. Spagnoli L.G., Bonanno E., Sangiorgi G., Mauriello A. Role of Inflammation in Atherosclerosis. *J Nucl Med.* 2007; 48 (11): 1800 – 15.
49. Talbot C., Plat J., Ritsch A., Mensink R.P. Determinants of cholesterol efflux capacity in humans. *Prog Lipid Res.* 2018; 69: 21 – 32.
50. Uint L., Sposito A., Ventura Brandizzi L.I, Yoshida V.M., Maranhão R.C., Luz P.L. Cellular Cholesterol Efflux Mediated by HDL Isolated from Subjects with Low HDL Levels and Coronary Artery Disease. *Arq Bras Cardiol* 2003; 81 (1): 39 – 41.
51. Wang T., Butany J. Pathogenesis of atherosclerosis. *Diagnostic histopathology* 2017; 23 (11): 473 – 78.
52. Wang M., Guo H., Wang S., Yang R., Li H., Zhao H. E. *et al.* The Measurement of High – Density Lipoprotein Mediated Cholesterol Efflux from Macrophage Cells by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Cell Physiol Biochem.* 2014; 34 (6): 1901 – 1911.
53. Zheng C., Aikawa M. High – Density lipoproteins: from function to therapy. *J Am Coll Cardiol.* 2012; 60 (23): 2380 – 83.