

## Fracțiunea difuzibilă a colesterolului seric și aterogeneza

dr. S. I. Csögör

Colesterolul, substanță greu solubilă în apă, se găsește în sînge în formă fixată de vehiculele sanguine. După părerea lui *Fredrickson* și colab. (1967), cea mai mare parte a colesterolului plasmatic este un component structural al lipoproteinelor (vehicule care servesc la transportul altor lipide) și nu poate fi privită ca o substanță vehiculată. Soarta colesterolului inclus în structura lipoproteinelor, respectiv fixat puternic de celelalte vehicule sanguine, este legată și determinată de soarta vehiculelor respective.

Cu ani în urmă am formulat o ipoteză de lucru pentru explicarea aterogenezei (*Csögör* și *Módy*, 1966), ipoteză bazată pe insuficiența capacității vehiculelor sanguine de a transporta lipide. Fixarea insuficientă, labilă a unor lipide de vehiculele sanguine facilitează dispariția lor din torrentul circulator.

În cele ce urmează prezentăm cîteva argumente care arată că în condiții biologice o fracțiune a colesterolului plasmatic nu este fixată puternic de structura vehiculelor sanguine și astfel în lipidele organismului ea difuzează independent de vehicule. După prezentarea unor date din literatură vom descrie examinările proprii referitoare la colesterolul difuzibil și vom analiza semnificația lor din punctul de vedere al aterogenezei.

### *Observații care indică existența fracțiunii difuzibile a colesterolului plasmatic*

— Colesterolul neesterificat este mobil între diferitele fracțiuni ale lipoproteinelor serice (*Roheim* și colab., 1963; *Shapiro* și colab., 1966).

— Co-esterolul neesterificat marcat se echilibrează în câteva ore între ficat și lipoproteinele plasmatică (Gould și colab., 1955; Eckles și colab., 1955), între lipoproteine și eritrocite (Hagerman și Gould, 1951; Murphy, 1962; Ashworth, 1964; Bruckdorfer și Green, 1967), respectiv celulele culturilor de țesuturi (Rothblat și Kritchevsky, 1967; Rothblat și colab., 1966). Știind că durata medie de viață a eritrocitelor este de 120 de zile, iar timpul mediu de înjumătățire al lipoproteinelor este de 2—6 zile (Avigan și colab., 1957; Furman și colab., 1964), echilibrarea rapidă a co-esterolului între lipoproteine și celule arată că o parte a co-esterolului din el este în stare difuzibilă și nu este inclusă definitiv, respectiv nu este fixată puternic de structurile proteice ale lipoproteinelor și ale celulelor.

— În culturile de țesuturi, diferite celule, care nu au nimic comun cu sinteza lipoproteinelor plasmatică, excretă colesterol. Colesterolul excretat de celulele culturilor de țesuturi este preluat de către proteinele serice din mediul de cultură, în primul rând de lipoproteinele alfa (Bailey, 1965; Burns și Rothblat, 1969; Rothblat și Kritchevsky, 1967; Dayton și Hashimoto, 1966). Putem presupune că colesterolul preluat de către proteinele serice nu mai poate fi înglobat în structura acestor vehicule și rămâne difuzibil.

— Raportul dintre co-esterolul neesterificat și cel esterificat care penetrează în aortă, în unitate de timp este de 2—4 ori mai mare, decît raportul dintre concentrația plasmatică a colesterolului liber și a celui esterificat (Newman și Zilversmit, 1962; 1966). Acest fapt a fost explicat de autorii citați prin dezintegrarea lipoproteinelor în timpul penetrării colesterolului în aortă, dar existența și mobilitatea mai mare a colesterolului neesterificat difuzibil poate să explice mai simplu și mai bine acest fenomen. După părerea lui Dayton și Hashimoto (1966) depășirea colesterolului liber din plasmă în peretele arterial este rezultatul schimbărilor fizico-chimice dintre lipoproteine și endotelu. În arterele normale sau ateromatose gradientul de concentrație al  $^3\text{H}$ -colesterolului scade dinspre interior spre exterior, în timp ce gradientul proteinelor plasmatică marcate are un sens opus (Adams și colab., 1968). La rîndul ei și această observație arată disocierea co-esterolului penetrat în peretele arterial, de lipoproteinele plasmatică.

— La oameni, după administrarea intravenoasă a colesterolului marcat, activitatea specifică a co-esterolului plasmatic scade în concordanță cu presupunerea că avem de a face cu două compartimente de colesterol dintre care unul este reinnoit mult mai repede decît celălalt (Frantz și Moore, 1969).

— Pe suprafața metalică sau siliconată a protezelor de valvă cardiacă se poate observa depunerea cristalelor de colesterol (Pierie și colab., 1968; Gibbons și colab., 1969). Sursa acestor cristale trebuie să fie fracțiunea difuzibilă a colesterolului plasmatic.

— Spectrul de rezonanță magnetică nucleară a lipidelor din lipoproteinele cu densitate mare este asemănător cu spectrul lipidelor dizolvate în solvenți organici sau al celor dispersate în apă cu ajutorul sărurilor biliare sau cu detergenți, respectiv prin sonicație. Acest fapt ne arată că în lipoproteinele serice lipidele sînt în „condiții fluide”, avînd posibilități de difuziune considerabile (Chapman și colab., 1969).

— Amestecînd serul uman cu ulei de vazelină, o parte a colesterolului difuzează în uleiul de vazelină, fără ca proteinele serice să sufere modificări decalabile prin determinarea spectrului de absorbție în regiunea u. v. (observație personală).

Pe baza celor de mai sus considerăm că, colesterolul seric se compune din două fracțiuni. Una este fixată puternic, respectiv este inclusă în structura lipoproteinelor, iar cealaltă fracțiune este difuzibilă, fiind transportată în sine împreună cu vehiculele proteice.

#### Determinarea colesterolului difuzibil

1.0 ml ser și 4.0 ulei de vazelină se introduc într-un tub de centrifugă. Amestecul este agitat intens și incubat timp de 2 ore la 37°C. Agitarea se repetă din 10 în 10 minute. Serul este separat de uleiul de vazelină prin centrifugare și

este recoltat cu ajutorul unei pipete capilare. Conținutul în colesterol al serurilor netratate, respectiv a celor tratate cu ulei de vazelină se determină cu metoda lui Zlatkis. Pentru a reduce mărimea erorilor metodologice, fiecare determinare se repetă de două ori. Cantitatea de colesterol care a difuzat în uleiul de vazelină (diferența dintre valoarea colesterolului determinată în serul original și cea obținută după tratarea serului cu ulei de vazelină) este proporțională cu cea a fracțiunii difuzibile a colesterolului seric. Astfel valorile găsite prin metoda prezentată sînt relative, fiindcă pe lângă fracțiunea difuzibilă a colesterolului, penetrarea colesterolului în uleiul de vazelină este influențată și de timpul de incubare, de coeficientul de repartiție al colesterolului între ser și uleiul de vazelină, de raportul dintre cantitatea serului și a uleiului, de amestecarea lor și de temperatură.

Urmărind în timp difuziunea colesterolului din ser în uleiul de vazelină am obținut curba prezentată în fig. nr. 1.

Pentru metoda standard, pentru a evita pe cit posibil modificările lipoproteinelor cauzate de incubarea lor la 37°C (Nichols și colab., 1968), am ales o perioadă de incubare de 2 ore. Dacă lucrăm în condiții standardizate, valorile găsite cu metoda prezentată sînt reproductibile și comparabile între ele, metoda fiind aptă pentru evidențierea modificărilor survenite în cantitatea colesterolului difuzibil.

În încheiere trebuie să accentuăm diferența esențială dintre metoda prezentată pentru determinarea fracțiunii difuzibile a colesterolului seric și examinările anterioare referitoare la extractibilitatea colesterolului din ser (Forbes și colab., 1957; Lemaire și colab., 1958; Étienne și colab., 1967). Această diferență constă în faptul că la determinarea fracțiunii difuzibile a colesterolului seric am evitat orice factor care ar putea modifica interacțiunea dintre colesterol și vehiculele sanguine (variații de temperatură, cloroform, eter etilic, tricloretilen, etanol, butanol, metilat, benzen), care s-au folosit la extragerea colesterolului. Din această cauză determinarea fracțiunii difuzibile a colesterolului are o semnificație biologică proprie.

#### Valorile fiziologice și modificările patologice ale fracțiunii difuzibile a colesterolului seric

Pentru a obține date orientative referitoare la valorile normale ale fracțiunii difuzibile a colesterolului seric am examinat serul obținut de la 32 de persoane sănătoase — donatori de sînge înainte a primei donații — 17 bărbați și 15 femei, avînd vîrsta între 19—45 de ani. La bărbați valoarea găsită a fost de  $12,5 \pm 1,7$  mg% (media aritmetică și eroarea standard a mediei), iar la femei de  $5,4 \pm 0,9$  mg%. Diferența dintre valorile observate la femei și la bărbați este foarte semnificativă, „p” fiind mai mic decît 0,01. Colesterolemia în grupele studiate a fost de 160 mg % la bărbați și 184 mg % la femei. Este de menționat discrepanța dintre colesterolemie și fracțiunea ei difuzibilă.

Colesterolemia în sîngele cordonului ombilical fiind scăzută (Renkonen, 1966), ni s-a părut interesantă determinarea fracțiunii difuzibile a colesterolului seric din sîngele cordonului ombilical. Examinările au fost efectuate pe 11 seruri, valoarea medie obținută fiind de  $14,6 \pm 1,8$  mg% pentru fracțiunea difuzibilă, iar pentru colesterolemie de 99 mg%.

În continuare am examinat pe 20 de persoane efectul lipemiei alimentare provocată prin consumare de unt, într-o cantitate de 0,75 g/kg corp și am constatat că fracțiunea difuzibilă a colesterolului seric nu prezintă modificări semnificative în timpul lipemiei alimentare.

Sedarismul asociat cu stressuri psihice este un factor aterogen unanim acceptat (Moga și Hărăguș, 1963). Pentru a obține date referitoare la efectul sedarismului asociat cu stressuri psihice asupra colesterolului difuzibil am examinat serurile obținute de la 20 de studenți aflați după o perioadă de

odihnă (vacanța de vară) și am comparat valorile găsite cu cele obținute în sesiunea de examene din ianuarie și iunie. Rezultatele sînt cuprinse în fig. nr. 2.

În sfîrșit am examinat serurile obținute de la bolnavi de diabet zaharat, ateroscleroză cerebrală incipientă cu sindrom neurasteniform și de la bolnavi de infarct miocardic. Rezultatele obținute sînt prezentate în tabelul nr. 1.

Tabelul nr. 1

Grupa	Coolesterolul difuzibil în mg %			Coolestero'ul total în mg %
	Nr.	M.A.	E.S.M.	M.A.
Donatori de sînge				
bărbați	17	12,5	1,7	160
femei	15	5,4	0,9	184
Studenți în octombrie				
bărbați	10	15,3	2,4	165
femei	10	10,1	1,8	173
Studenți în ianuarie				
bărbați	9	24,2	1,7	171
femei	8	18,5	2,7	173
Studenți în iunie				
bărbați	5	17,8	0,6	179
femei	7	18,7	1,7	195
Nou-născuți	11	14,6	1,8	99
Bolnavi diabetici				
bărbați	5	39,0	3,7	283
femei	15	20,9	1,9	201
Ateroscleroză cerebrală				
bărbați	2	30,3		202
femei	7	16,0		215
Infarct miocardic				
bărbați	9	33,3		211
femei	2	16,5		239

Valoarea fracțiunii difuzibile a colestero'ul seric în diferite condiții fiziologice și patologice, M. A. = media aritmetică; E.S.M. = eroarea standard a mediei; Nr. = numărul examinărilor.

#### Discuția rezultatelor

Din examinările efectuate pe serurile obținute de la donatorii de sînge reiese că între fracțiunea difuzibilă a colestero'lului seric și colestero'emie nu este o corelație pozitivă obligatorie și că mărimea fracțiunii difuzibile a colestero'lului seric este semnificativ mai mare la bărbați decît la femei. Lipsa corelației dintre colestero'emie și fracțiunea difuzibilă a colestero'lului seric reiese foarte clar din rezultatele obținute în urma examinărilor efectuate pe serurile provenite din sîngele cordonului ombilical.

Faptul că lipemia alimentară nu influențează într-un mod semnificativ transportul sanguin al colesterolului este în concordanță cu observațiile referitoare la existența unui mecanism homeostatic care intervine în metabolismul colesterolului (vezi Taylor și colab., 1967; Frantz și Moore, 1969; Moga și colab., 1970).

Ni se par deosebit de interesante datele referitoare la creșterea rapidă a fracțiunii difuzibile a colesterolului seric în urma acțiunii stressului psihic asociat cu sedentarism. La evaluarea acestor date experimentale, obținute în diferite perioade ale anului, ar trebui să avem în vedere eventualele modificări survenite în metabolismul colesterolic, cauzate de schimbările care au loc în alimentația persoanelor examinate. Totuși, faptul că într-o perioadă de 3 luni la studenți mărirea fracțiunii difuzibile a colesterolului seric a crescut cu 54%, în timp ce la donatorii de sânge nu am remarcat modificări importante ale acestui parametru, ne determină să credem că modificarea observată la studenți este determinată în primul rând de factorul aterogen studiat.

### Colesterolul difuzibil și aterogeneza

Examinarea unui vast material necroptic a arătat că aterogeneza începe în primii ani de viață și că la toți copiii decedați la o vîrstă de peste 3 ani se pot observa semnele incipiente ale aterosclerozei (Strong și McGill, 1969). Din această cauză diagnosticul clinic al aterosclerozei incipiente, evidențierea trecerii de la normal la patologic nu este posibilă. Acest fapt îngreunează în mod considerabil studiul aterogenezei și a orientat atenția cercetătorilor spre studiul factorilor aterogeni. În cele ce urmează vom analiza relația dintre mărirea fracțiunii difuzibile a colesterolului seric și factorii aterogeni, respectiv aterogeneza.

Difuziunea este unul din factorii care stau la baza distribuției substanțelor în organism, iar difuzibilitatea la rîndul ei este influențată în mare măsură de dimensiunile moleculelor. Moleculele mici, asociindu-se cu macromolecule proteice (vehicule plasmatică) își modifică proprietățile de difuziune. Astfel spațiul de distribuție al substanțelor fixate de vehiculele sanguine este limitat la spațiul de distribuție al vehiculelor. Din această cauză dacă vrem să obținem date referitoare la oferta de colesterol la care sînt expuse țesuturile organismului, în loc de colesterolemie va trebui să determinăm fracțiunea difuzibilă a colesterolului seric.

Experiențele cu izotopi au demonstrat că cea mai mare parte a colesterolului din arterele normale sau ateromatoase provine din plasma sanguină (Dayton, 1959; Whereat, 1967; Mizuguchi, 1968). Colesterolul din plăcile ateromatoase este într-o stare labilă, fiind în echilibru cu colesterolul plasmatic (Gould și colab., 1959; Chobanian și Hollander, 1962; Botz, 1968). Din punct de vedere fizico-chimic acumularea colesterolului în peretele arterial este o deplasare a echilibrului determinat de trei factori: (1) oferta sanguină de colesterol, (2) capacitatea elementelor țesuturilor de a fixa colesterol și (3) viteza schimburilor de colesterol dintre peretele vascular și sânge, respectiv alte țesuturi. Din această cauză creșterea fracțiunii difuzibile a colesterolului, a ofertei de colesterol, prezintă un interes deosebit din punctul de vedere al aterogenezei, respectiv al evidențierii precoce a procesului aterogen și evaluarea eficacității măsurilor terapeutice.

Datele preliminare prezentate în această lucrare evidențiază corelația dintre factorii aterogeni și fracțiunea difuzibilă a colesterolului seric. Astfel apare ca o necesitate urgentă elaborarea și înfăptuirea unui program de cercetare care ar putea stabili valoarea clinică a existenței și a determinării fracțiunii difuzibile a colesterolului seric.

Sosit la redacție: 8 octombrie 1970.

5 I. COGĂR: FRACTIUNEA DIFUZIBILĂ A COLESTEROLULUI SERIC ȘI ATEROGENEZA

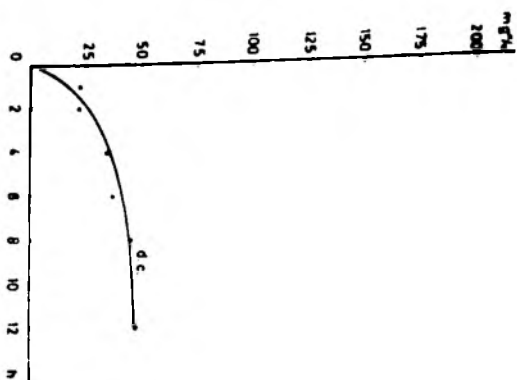


Fig. nr. 1: Difuziunea colesterolului din ser în uleiul de vazelină. Curba d.c. reprezintă colesterolul care a difuzat în uleiul de vazelină. Iar coloana t.c. arată valoarea colesteroliei

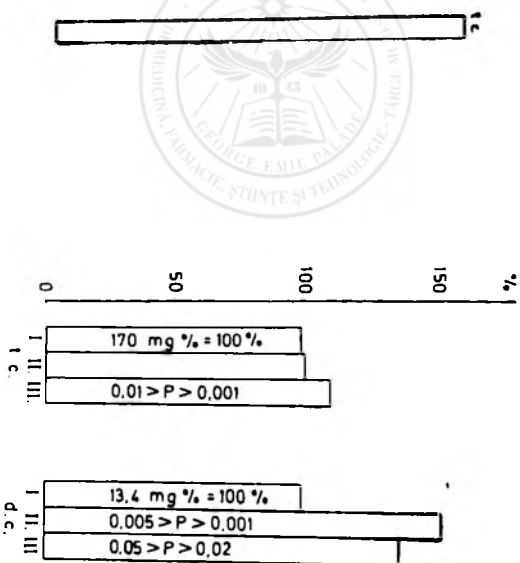


Fig. nr. 2: Valoarea colesteroliei (t.c.) și a fracțiunii difuzibile a colesterolului (d.c.) după vacanța de vară (colcana I) și în timpul sesiunii de examene din ianuarie și iunie (coloana II și III)

1. ADAMS C. W. M., VIRAG S., MORGAN R. S., ORTON C. C.: *J. Atheroscler. Res.*, (1968), 8, 679; 2. ASHWORTH L. A. E., GREEN C.: *Biochim. biophys. Acta*, (1964), 84, 182; 3. AVIGAN J., EDER H. A., ŞTEINBERG D.: *Proc. Soc. exp. Biol. N. Y.*, (1957), 95, 429; 4. BAILEY M.: *Exp. Cell Res.*, (1965), 37, 175; 5. BORTZ W. M.: *Circulat. Res.*, (1968), 22, 135; 6. BURNS C. H., ROTHBLAT G. H.: *Biochim. biophys. Acta*, (1969), 176, 616; 7. BRUCKDORFER K. R., GREEN C.: *Biochem. J.*, (1967), 104, 270; 8. CHAPMAN D., LESLIE R. B., HIRZ R., SCANU A. M.: *Biochim. biophys. Acta*, (1969), 176, 524; 9. CHOBANIAN A. V., HOLLANDER W.: *J. clin. Invest.*, (1962), 41, 1732; 10. CSÖGÖR S., MÓDY J.: *Nature, Lond.*, (1966), 210, 545; 11. DAYTON S.: *Circulat. Res.*, (1959), 7, 468; 12. DAYTON S., HASHIMOTO S.: *Circulat. Res.*, (1966), 19, 1041; 13. ECKLES N. E., TAYLOR C. B., CAMPBELL D. J., GOULD R. G.: *J. Lab. clin. Med.*, (1955), 46, 359; 14. ÉTIENNE J., AYRAULT-JARRIER M., COTTET J., DERVICHIAN D. G.: *Presse méd.*, (1967), 75, 1397; 15. FORBES J. C., WATLINGTON C. O., WASSERMAN A. J., CAMP P. D., TUKER W. T., PETTERSON O. N.: *Proc. Soc. exp. Biol. N. Y.*, (1957), 95, 546; 16. FRANTZ I. D., MOODRE R. B.: *Amer. J. Med.*, (1969), 46, 684; 17. FREDRICKSON D. S., LEVY R. I., LEES R. S.: *New Engl. J. Med.*, (1967), 276, 32, 94, 148, 215, 273; 18. FURMAN R. H., SANBAR S. S., ALAUPOVIC P., BRADFORD R. H., HOWARD R. P.: *J. Lab. clin. Med.* (1964), 63, 193; 19. GIBBONS J. R. P., ALLADINE F. F., LITTLE K.: *British med. J.*, (1969), 1, 709; 20. GOULD G. R., JONES R. J., WISSLER R. W.: *Circulation*, (1959), 20, 967; 21. GOULD G. R., LeROY G. V., OKITA G. T., KABARA J. J., KEEGAN P., BERGENSTAL D. M.: *J. Lab. clin. Med.*, (1955), 46, 372; 22. HAGERMAN J. S., GOULD R. G.: *Proc. Soc. exp. Med. N. Y.*, (1951), 78, 329; 23. LEMAIRE A., COTTET J., LOEPER J., LEDERMANN S.: *Presse méd.*, (1958), 66, 1431; 24. MIZUGUCHI T.: *Jap. Heart. J.*, (1968), 9, 34; 25. MOGA A., CUCUIANU M., ORHA I., VLAICU R.: *Hipertensiunea arterială și ateroscleroza*. Ed. Medicală, Bucureşti, (1970); 26. MOGA A., HĂRĂGUŞ S.: *Ateroscleroza*. Ed. Academiei R.P.R., Bucureşti, (1963), 27. MURPHY J. R.: *J. Lab. clin. Med.*, (1962), 60, 571; 28. NEWMAN H. A. I., ZILVERSMIT D. B.: *J. biol. Chem.*, (1962), 237, 2078; 29. NEWMAN H. A. I., ZILVERSMIT D. B.: *Circulat. Res.*, (1966), 18, 293; 30. NICHOLS A. V., COGGIOLA E. L., JENSEN L. C., YOKOYAMA E. H.: *Biochim. biophys. Acta*, (1968), 168, 87; 31. PIERIE W. R., HANCOCK W. D., KOORAJIAN S., STARR A.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, (1968), 146, 345; 32. RENKONEN O. V.: *Ann. Med. exp. Fenn.*, (1966), 44, suppl. 10, 48; 33. ROHEIM P. S., HAFT D. E., GIDEZ L. E., WHITE A., EDER H. A.: *J. clin. Invest.*, (1963), 42, 1277; 34. ROTHBLAT G. H., HARTZEL R. W., MIALHE H., KRITCHEVSKY D.: *Biochim. biophys. Acta*, (1966), 116, 133; 35. ROTHBLAT G. H., KRITCHEVSKY D.: *Biochim. biophys. Acta*, (1967), 144, 423; 36. SHAPIRO I. L., JASTREMSKY J. A., KRITCHEVSKY D.: *Life Sci.*, (1966), 5, 1423; 37. STRONG J. P., MCGILL H. C. Jr.: *J. Atheroscler. Res.*, (1969), 9, 251; 38. TAYLOR C. B., MIKKELSON B., ANDERSON J. A., FORMAN D. T., ASDEL A. K., HO K. J.: *Med. Times*, (1967), 95, 489; 39. WHEREAT A. F.: *Exp. molec. Path.*, (1967), 7, 233