

Neinvazivní *SRY*, *RHD* a *RHCE* genotypizace plodu z periferní krve těhotných žen na 7300 real-time PCR systému

Hromadníková I.¹, Veselá K.¹, Schrollová R.³, Doucha J.²

¹Laboratoř buněčné biologie, Pediatrická klinika, 2. LF UK a Fakultní nemocnice Motol, Praha

²Gynekologicko-porodnická klinika, 2. LF UK a Fakultní nemocnice Motol, Praha

³Krevní banka, 2. LF UK a Fakultní nemocnice Motol, Praha

SOUHRN

Cíl studie: Dopusud používaný ABI PRISM 7700 sekvenční detekční systém se již přestal vyrábět, řada laboratoří je proto nucena převést dosavadní neinvazivní prenatalní diagnostiku na nové přístrojové vybavení. V této studii se zaměřujeme na testování použití 7300 real-time PCR systému pro účely rutinního neinvazivního určení pohlaví, *RHD* a *RHCE* genotypu plodu.

Název a sídlo pracoviště: Laboratoř buněčné biologie, Pediatrická klinika, 2. LF UK a FN Motol Praha.

Materiál a metody: Hodnotíme amplifikaci paternálních alel na extracelulární DNA izolované z mateřské periferní krve pomocí QIAamp DSP Virus kitu (c a E alely *RHCE* genu) a QIAamp DNA Blood Mini kitu (*SRY*, *RHD* a C alela *RHCE* genů) u 22 těhotných žen v rozmezí 10.–38. týdne gravidity.

Výsledky: *SRY* (n = 6), *RHD* (exon 7 a exon 10, n = 7) a *RHCE* (C alela, n = 3; c alela, n = 3; E alela, n = 3) genotypizace plodu provedené na 7300 real-time PCR systému byly ve shodě s pohlavím a Rh fenotypem plodu či narozeného dítěte u všech vyšetřených těhotných žen.

Závěr: Prokázali jsme, že 7300 real-time PCR systém je dostatečně citlivý pro detekci paternálních alel na fetální DNA přítomné v extracelulární DNA izolované z mateřské plazmy. Tímto způsobem můžeme nadále i po vyřazení ABI PRISM 7700 sekvenčního detekčního systému z provozu zajišťovat spolehlivé neinvazivní určení pohlaví plodu u těhotenství s rizikem X-vázaných onemocnění u plodu a neinvazivní *RHD* a *RHCE* genotypizaci plodu u aloimunizovaných těhotenství s rizikem fetální erythroblastózy.

Klíčová slova: extracelulární fetální DNA, kvantitativní PCR v reálném čase, *RHD* gen, *RHCE* gen.

SUMMARY

Hromadníková I., Veselá K., Schrollová R., Doucha J.: Non-invasive fetal *SRY*, *RHD* and *RHCE* genotyping from maternal peripheral blood by using 7300 Real-Time PCR System

Objective: Since ABI PRISM 7700 sequence detection system has not already been commercially available, quite a number of laboratories are obliged to perform actual non-invasive prenatal diagnosis from maternal peripheral blood on new equipment. The purpose of this study was to test the usage of 7300 real-time PCR system for the purpose of routine non-invasive fetal sex determination and fetal *RHD* and *RHCE* genotyping.

Settings: Cell Biology Laboratory, Paediatric Clinic, 2nd Medical Faculty and University Hospital Motol Prague.

Material and Methods: We evaluated paternal allele amplification on extracellular DNA isolated from maternal peripheral blood by using QIAamp DSP Virus kit (c and E alleles of *RHCE* gene) and QIAamp DNA Blood Mini kit (*SRY*, *RHD* and C allele of *RHCE* gene) in a cohort of 22 pregnant women within 10th and 38th week of pregnancy.

Results: The results of fetal *SRY* (n = 6), *RHD* (exon 7 and exon 10, n = 7) and *RHCE* (C allele, n = 3; c allele, n = 3; E allele, n = 3) genotyping performed on 7300 real-time PCR system corresponded to sex and/or Rh phenotype of the fetus or the newborn in all tested pregnant women.

We showed that 7300 real-time PCR system is sensitive enough for paternal allele detection performed on fetal DNA fraction within extracellular DNA isolated from maternal plasma.

Conclusion: After ABI PRISM 7700 sequence detection system would be completely taken out of service, we would be able henceforth to provide reliable non-invasive fetal sex determination in pregnancies at risk of X-linked disorders and non-invasive fetal *RHD* and *RHCE* genotyping in alloimmunized pregnancies at risk of haemolytic disease of newborn.

Key words: extracellular fetal DNA, real-time PCR, *RHD* gene, *RHCE* gene.

Úvod

Neinvazivní prenatalní *RHD* a *RHCE* genotypizace plodu umožňuje identifikaci plodů v riziku fetální erythroblastózy u aloimunizovaných těhotenství [1, 2, 5, 13]. Neinvazivní určení pohlaví plodu umožňuje provedení invazivního prenatalního vyšetření (biopsie choriových klků, amniocentéza) pouze u těch těhotenství s rizikem X-vázaných onemocnění plodu, u kterých byl neinvazivně určen plod mužského pohlaví [3, 4, 8].

Dopusud používaný ABI PRISM 7700 sekvenční detekční systém se již přestal vyrábět, řada laboratoří je proto nucena převést dosavadní diagnostiku na nové přístro-

je. V této studii se zaměřujeme na testování použití 7300 real-time PCR systému pro účely neinvazivní prenatalní diagnostiky – určení pohlaví, *RHD* a *RHCE* genotypu plodu. Hodnotíme amplifikaci paternálních alel na extracelulární DNA izolované z mateřské periferní krve pomocí QIAamp DSP Virus kitu (c a E alely *RHCE* genu) a QIAamp DNA Blood Mini kitu (*SRY*, *RHD* a C alela *RHCE* genu).

Materiál a metodika

Celkem bylo testováno 22 těhotných žen v rozmezí 10.–38. týdne gravidity s převahou pacientek v 1. tri-

mestru gravidity (n = 17), kdy je neinvazivní prenatalní diagnostika nejžádanější. Pacientky daly informovaný souhlas s odběrem periferní krve pro toto vyšetření.

Příprava plazmy

Plazma byla připravena z 10 ml nesrážlivé periferní krve (EDTA) nejpozději 24 hodin po odběru (centrifugace 1200 g, 10 minut). Poté byla plazma stočena z vaku a skladována při -80°C až do dalšího zpracování. Pro minimalizaci rizika kontaminace vzorků jsme prováděli veškeré zpracování biologického materiálu v laminárním boxu třídy II a pro pipetování jsme používali aerosol rezistentní špičky.

Izolace DNA z mateřské plazmy pomocí QIAamp DSP Virus kitu

Detekce paternálních Rhc a RhE alel RHCE genu byla prováděna na extracelulární DNA izolované z mateřské plazmy pouze pomocí QIAamp DSP Virus kitu, jelikož výsledky našich předchozích analýz prokázaly, že QIAamp DSP Virus kit zvyšuje výtěžnost extracelulární fetální DNA přítomné v mateřské plazmě, což je klíčové zejména u amplifikace paternálně zděděných alel, které se liší od alel maternálních pouze v jednom nukleotidu [14].

DNA byla extrahována z 1 ml mateřské plazmy za použití QIAamp DSP Virus kitu (Qiagen, Hilden, Germany) podle modifikovaného protokolu výrobce. Snížené množství QIAGEN Proteázy (20 µl) bylo použito k rozštěpení proteinů. Odstranění reziduálních solí a proteinů bylo provedeno vakuovým systémem (QIAvac 24 Plus, Qiagen, Hilden, Germany) a bylo rovněž použito snížené množství promývacích pufrů (600 µl AW1, 750 µl AW2, 750 µl etanol). DNA byla eluována 60 µl AVE pufru a 15,0 µl eluátu bylo použito pro amplifikaci paternálních alel.

Izolace DNA z mateřské plazmy pomocí QIAamp DNA Blood Mini kitu

Amplifikace SRY, RHD a C alely RHCE genu byla provedena na extracelulární DNA extrahované z mateřské plazmy prostřednictvím QIAamp DNA Blood Mini kitu (14).

DNA byla extrahována z 1 ml mateřské plazmy za použití QIAamp DNA Blood Mini kitu (Qiagen, Hilden, Germany) podle modifikovaného protokolu výrobce. Snížené množství QIAGEN Proteázy (20 µl) bylo použito k rozštěpení proteinů. Odstranění reziduálních solí a proteinů bylo provedeno centrifugačně (bez použití vakuového systému) a bylo rovněž použito snížené množství promývacích pufrů (500 µl AW1, 500 µl AW2). K úplnému odstranění promývacích roztoků byl zařazen navíc centrifugační krok (20 000 g, 1 minuta). DNA byla eluována 60 µl AE pufru a 15,0 µl eluátu bylo použito pro amplifikaci paternálních alel (nepublikovaná data SAFE NoE workshop).

PCR v reálném čase

Analýza byla provedena na 7300 real-time PCR systému (Applied Biosystem, Branchburg, New Jer-

sey, USA). PCR reakční směs (celkový objem 50 µl) obsahovala TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystem, Branchburg, New Jersey, USA), optimalizované primery (300 nM pro SRY, RHCE a 200 nM pro RHD exon 10), TaqMan sondu (200 nM pro SRY, RHCE a 100 nM pro RHD exon 10) a 15 µl templátu. Podmínky PCR reakce byly nastaveny podle manuálu výrobce (2minutová preinkubace při 50 °C potřebná pro aktivaci AmpErase Uracil N-glykosylázy s následnou 10minutovou preinkubací při 95 °C nutnou pro aktivaci AmpliTaq Gold DNA polymázy; dále 50 cyklů při 95 °C 15 s (denaturace DNA) a 60 °C 1 min (anelace a syntéza DNA).

Každý vzorek DNA izolovaný z mateřské plazmy byl analyzován v osmijamkových stripech v 6 replikátech (2 DNA izolace). Pozitivní výsledek byl hodnocen jako detekce fluorescenčního signálu v jamce před 40. cyklem (Ct < 40) po manuální analýze při stejné hodnotě thresholdu (nastavení stejného thresholdu ve všech analýzách umožňuje srovnávat data z jednotlivých analýz i bez provedení kvantifikace prostřednictvím standardní křivky).

Sekvence jednotlivých primerů a TaqMan sond byly již publikovány v předchozích článcích [1–14].

Výsledky

Hodnotili jsme výsledky amplifikace paternálních alel na extracelulární DNA izolované z mateřské periferní krve pomocí QIAamp DSP Virus kitu a QIAamp DNA Blood Mini kitu na 7300 real-time PCR systému (obr. 1, 2). Výsledky neinvazivního prenatalního vyšetření RHD a RHCE genotypu plodu jsme korelovali s výsledky imunohematologické analýzy pupečnickové krve po narození dítěte.

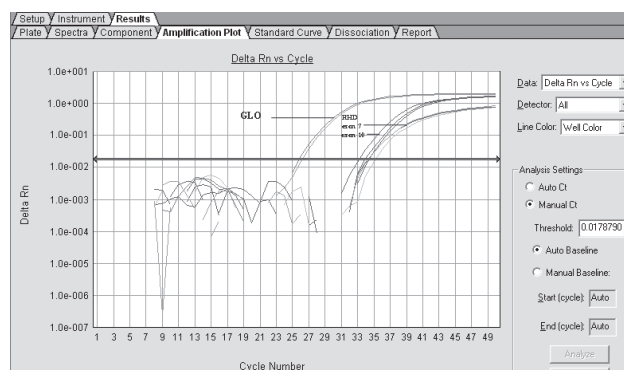


Fig. 1. Amplification of *RHD* gene (exon 7 and 10) on extracellular DNA isolated from peripheral maternal blood of *RHD* negative pregnant woman using QIAamp DNA Blood Mini Kit and 7300 real-time PCR system (patient n. 1200, see Table 1)

Amplification of β -globin gene (*GLO* Ct: 25.66, 26.12) detects total DNA and amplification of *RHD* gene (*RHD* exon 10: 34.30, 33.15, 33.91 a *RHD* exon 7: 35.11, 34.22, 34.25) detects presence of fetal DNA in extracellular DNA isolated from maternal peripheral blood.

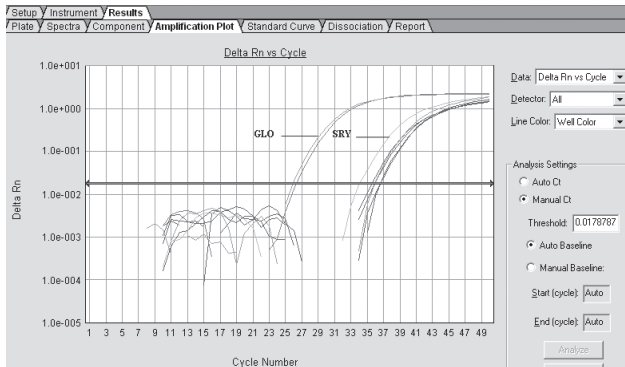


Fig. 2 Amplification of *SRY* gene on extracellular DNA isolated from maternal peripheral blood using QIAamp DNA Blood Mini kit and 7300 real-time PCR systém (patient n. 1194, See Table 1) Amplification of β -globin gene (*GLO* Ct: 27.42, 27.00) detects total DNA and amplification of *SRY* gene (Ct: 35.50, 35.87, 36.50, 34.08, 36.56, 35.89) detects presence of fetal DNA in extracellular DNA isolated from maternal peripheral blood.

Výsledky neinvazivní *SRY* genotypizace plodu jsme srovnávali s karyotypem plodu po invazivním vyšetření (biopsie choriových klků a amniocentéza) či s pohlavím dítěte.

Výsledky *SRY* (n = 6), *RHD* (exon 7 a exon 10, n = 7) a *RHCE* (C alela, n = 3; c alela, n = 3; E alela, n = 3) genotypizace plodu provedené na 7300 real-time PCR systému byly ve shodě s pohlavím a Rh fenotypem plodu či narozeného dítěte u všech vyšetřených těhotných žen (tab. 1).

Table 1. Amplification of *SRY*, *RHD* a *RHCE* genes on extracellular DNA isolated from maternal peripheral blood by using QIAamp DSP Virus kit and QIAamp DNA Blood Mini kit by 7300 real-time PCR system

SN	IN	Week of gravidity	Amplification of paternal alleles Ct	Rh phenotype karyotype
1	1186	12	6/6 E allele RHCE + 37.04, 37.36, 36.27, 36.87, 36.17, 36.00 <i>QIAamp DSP Virus kit</i>	RhE +
2	1420	12	6/6 E allele RHCE + 38.67, 37.77, 37.68, 36.35, 36.03, 39.45 <i>QIAamp DSP Virus kit</i>	RhE +
3	1589	12	6/6 E allele RHCE + 33.19, 33.73, 33.05, 34.57, 35.04, 35.11 <i>QIAamp DSP Virus kit</i>	RhE +
4	1230	12	6/6 C allele RHCE + 34.37, 34.70, 35.35, 34.08, 34.45, 34.00 <i>QIAamp DNA Blood Mini kit</i>	RhC +
5	827	37	6/6 C allele RHCE + 33.32, 33.22, 33.25, 32.91, 33.39, 33.25 <i>QIAamp DNA Blood Mini kit</i>	RhC +
6	834	38	6/6 C allele RHCE + 29.43, 29.09, 29.22, 28.94, 29.04, 28.72 <i>QIAamp DNA Blood Mini kit</i>	RhC +

SN	IN	Week of gravidity	Amplification of paternal alleles Ct	Rh phenotype karyotype
7	1472	12	4/6 c allele RHCE + 41.49, 43.12, 40.00, 39.50, 40.00, 38.11 <i>QIAamp DSP Virus kit</i>	Rhc +
8	1498	12	6/6 c allele RHCE + 39.64, 39.71, 39.09, 37.01, 36.93, 36.22 <i>QIAamp DSP Virus kit</i>	Rhc +
9	1456	12	5/6 c allele RHCE + 40.00, 39.21, 41.11, 40.00, 39.77, 39.48 <i>QIAamp DSP Virus kit</i>	Rhc +
10	1200	12	6/6 RHD + RHD exon 10: 34.30, 33.15, 33.9 RHD exon 7: 35.11, 34.22, 34.251 <i>QIAamp DNA Blood Mini kit</i>	RhD +
11	1570	12	6/6 RHD + RHD exon 10: 35.37, 35.05, 35.48 RHD exon 7: 38.10, 37.12, 37.26 <i>QIAamp DNA Blood Mini kit</i>	RhD +
12	1306	12	6/6 RHD + RHD exon 10: 37.83, 36.02, 38.19 RHD exon 7: 37.06, 36.57, 36.58 <i>QIAamp DNA Blood Mini kit</i>	RhD +
13	1855	28	6/6 RHD + RHD exon 10: 34.62, 35.07, 35.06 RHD exon 7: 35.86, 36.10, 37.18 <i>QIAamp DNA Blood Mini kit</i>	RhD +
14	1856	34	6/6 RHD + RHD exon 10: 30.91, 30.95, 31.25 RHD exon 7: 33.05, 32.83, 32.07 <i>QIAamp DNA Blood Mini kit</i>	RhD +
15	1504	13	6/6 RHD + RHD exon 10: 34.49, 34.67, 34.53 RHD exon 7: 35.72, 36.28, 35.27 <i>QIAamp DNA Blood Mini kit</i>	RhD +
16	1738	12	3/3 RHD + RHD exon 10: 37.79, 35.80, 34.25 <i>QIAamp DNA Blood Mini kit</i>	RhD +
17	1194	12	6/6 SRY + 35.50, 35.87, 36.50, 34.08, 36.56, 35.89 <i>QIAamp DNA Blood Mini kit</i>	46,XY
18	1217	12	5/6 SRY + 38.51, 36.90, 50.00, 38.99, 39.66, 39.29 <i>QIAamp DNA Blood Mini kit</i>	46,XY

SN	IN	Week of gravidity	Amplification of paternal alleles Ct	Rh phenotype karyotype
19	1055	12	5/6 SRY + 36.00, 36.19, 36.27, 35.16, 35.97, 35.12 QIAamp DNA Blood Mini kit	46,XY
20	1002	12	6/6 SRY + 38.01, 35.41, 35.56, 36.06, 35.72, 36.00 QIAamp DNA Blood Mini kit	46,XY
21	1842	12	6/6 SRY + 37.78, 36.84, 37.38, 36.13, 37.65, 35.35 QIAamp DNA Blood Mini kit	46,XY
22	1843	12	6/6 SRY + 33.03, 33.32, 33.04, 32.85, 33.41, 33.24 QIAamp DNA Blood Mini kit	46,XY

Diskuse

Doposud používaný ABI PRISM 7700 sekvenční detekční systém se již přestal vyrábět, proto je řada laboratorí nucena převést dosavadní diagnostiku na nové přístroje. Některá zahraniční pracoviště nahradila doposud používaný ABI PRISM 7700 sekvenční detekční systém Perkin-Elmer Applied Biosystems 7000 [15, 16] a nebo 7900 sekvenčním detekčním systémem [17], jiná pracoviště 7500 real-time PCR systémem [18].

7300 real-time PCR systém představuje novou cenově dostupnější generaci přístrojů pro detekci a kvantifikaci nukleových kyselin. V této studii jsme se zaměřili na testování použití 7300 real-time PCR systému pro účely neinvazivní prenatální diagnostiky – určení pohlaví, RHD a RHCE genotypu plodu. Hodnotili jsme amplifikaci paternálních alel na extracelulární DNA izolované z mateřské periferní krve pomocí QIAamp DSP Virus kitu (c a E alely RHCE genu) a QIAamp DNA Blood Mini kitu (SRY, RHD a C alely RHCE genu).

Výsledky našich analýz prokázaly, že 7300 real-time PCR systém je dostatečně citlivý pro detekci paternálních alel na fetální DNA přítomné v extracelulární DNA izolované z mateřské plazmy.

Tímto způsobem můžeme nadále i po vyřazení ABI PRISM 7700 sekvenčního detekčního systému z provozu zajišťovat spolehlivé neinvazivní určení pohlaví plodu u těhotenství s rizikem X-vázaných onemocnění u plodu a neinvazivní RHD a RHCE genotypizaci plodu u aloimmunizovaných těhotenství s rizikem fetální erythroblastózy.

Literatura

- Lo, Y. M. D., Hjelm, N. M., Fidler, C. et al. Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. *N. Engl. J. Med.*, 1998, 339, p. 1734–1738.
- Legler, T. J., Lynen, R., Maas, J. H. et al. Prediction of fetal RhD and Rh CcEe phenotype from maternal plasma with real-

time polymerase chain reaction. *Transfus. Apheresis Sci.*, 2002, 27, p. 217–223.

- Lo, Y. M. D., Corbetta, N., Chamberlain, P. F. et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*, 1997, 350, p. 485–487.
- Lo, Y. M. D., Tein, M. S. C., Lau, T. K. et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum. Implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am. J. Hum. Genet.*, 1998, 62, p. 768–775.
- Hromadníková, I., Veselá, K., Benešová, B. et al. Non-invasive fetal RHD and RHCE genotyping from maternal plasma in alloimmunized pregnancies. *Prenat. Diagn.*, 2005, 25, 12, p. 1079–1083.
- Hromadníková, I., Vechetová, L., Veselá, K. et al. Non-invasive fetal RHD exon 7 and exon 10 genotyping using real-time PCR testing of fetal DNA in maternal plasma. *Fetal Diagn. Ther.*, 2005, 20, p. 275–280.
- Hromadníková, I., Vechetová, L., Veselá, K., Benešová, B., Doucha, J., Vlk, R. Non-invasive fetal RHD and RHCE genotyping using real-time PCR testing of maternal plasma in Rh D negative pregnancies. *J. Histochem. Cytochem.*, 2005, 53, p. 301–305.
- Hromadníková, I., Houbová, B., Hridelová, D. et al. Replicate real-time PCR testing of DNA in maternal plasma increases the sensitivity of non-invasive fetal sex determination. *Prenat. Diagn.*, 2003, 23, p. 235–238.
- Hromadníková, I., Houbová, B., Hridelová, D. et al. Quantitative analysis of DNA levels in maternal plasma in normal and Down syndrome pregnancies. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 2002, 2, p. 4.
- Hromadníková, I., Vechetová, L., Veselá, K. et al. Neinvazivní RHD genotypizace plodu na DNA izolované z periferní krve RhD negativních těhotných žen. *Transfuzie a hematologie dnes*, 2003, 4, s. 151–158.
- Hromadníková, I., Benešová, B., Vechetová, L. et al. Neinvazivní RHD, RHC a RHE genotypizace plodu z periferní krve RhD negativních těhotných žen. *Transfuzie a hematologie dnes*, 2004, 1, s. 13–17.
- Hromadníková, I., Doucha, J., Benešová, B., Veselá, K., Rožňáková, E., Hakenová, A. Neinvazivní RHc genotypizace plodu z periferní krve těhotných žen. *Transfuzie a hematologie dnes*, 2005, 1, s. 14–16.
- Hromadníková, I., Veselá, K., Benešová, B. et al. První zkušenosti s neinvazivní RH genotypizací plodu z periferní krve u aloimmunizovaných těhotenství. *Transfuzie a hematologie dnes*, 2005, 1, s. 17–20.
- Hromadníková, I., Žejšková, L., Veselá, K. et al. Optimalizace izolace extracelulární fetální DNA pro neinvazivní SRY, RHD a RHCE genotypizaci plodu z periferní krve těhotných žen. *Transfuzie a hematologie dnes*, 2006.
- Li, Y., Di Naro, E., Vitucci, A., Zimmermann, B., Holzgreve, W., Hahn, S. Detection of paternally inherited fetal point mutations for beta-thalassemia using size-fractionated cell-free DNA in maternal plasma. *JAMA*, 2005, 293, p. 843–849.
- Li, Y., Zimmermann, B., Rusterholz, C., Kang, A., Holzgreve, W., Hahn, S. Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms. *Clin. Chem.*, 2004, 50, p. 1002–1011.
- Masuzaki, H., Miura, K., Yoshiura, K. et al. Placental mRNA in maternal plasma and its clinical application to the evaluation of placental status in a pregnant woman with placenta previa-percreta. *Clin. Chem.*, 2005, 51, p. 923–925.

18. Clausen, F. B., Krog, G. R., Rieneck, K. et al. Reliable test for prenatal prediction of fetal RhD type using maternal plasma from RhD negative women. *Prenat. Dian.*, 2005, 25, p. 1040–1044.

Tato práce vznikla za podpory MSM 0021620806 a MZO 00064203.

Do redakce došlo 7. 7. 2006.

Adresa pro korespondenci:
Doc. RNDr. Ilona Hromadníková, Ph.D.
Laboratoř buněčné biologie
Pediatrická klinika
2. LF UK a FN Motol Praha
V Úvalu 84
150 06 Praha 5
email: ilona.hromadnikova@lfmotol.cuni.cz

Zaujalo nás

Proaterogenní HDL

Už dlouho je známo, že zvýšená hladina cholesterolu v krvi nemusí vždy znamenat zvýšené riziko kardiovaskulárních onemocnění, laicky řečeno – v krvi koluje "cholesterol špatný" a "cholesterol dobrý". Máme tedy lipoproteinové částice: proaterogenní – LDL a antiaterogenní – HDL. V obojích částicích však existuje velká heterogenita, nejenom ve velikosti, ale též v účinku. Víme, že nejnebezpečnější jsou tzv. malé denzní LDL, které jsou velmi náchylné k oxidaci (eventuálně jiné alteraci) s následným škodlivým účinkem na stěnu arterií. Nedávno publikovali Mohamed Navab et al. v *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* [2006, 2 (9): 504 až 511] článek o proaterogenních HDL-částicích (Mechanisms of Disease: Proatherogenic HDL – An Evolving Field). V pokusech na laboratorních zvířatech totiž prokázali, že HDL hraje nejenom důležitou funkci ve zpětném transportu přebytečného cholesterolu ze stěny arterií zpět do jater, ale že má i významnou úlohu jako modulátor systémové zánětlivé reakce. V nepřítomnosti zánětu mají HDL k dispozici sadu antioxidantních enzymů (paraoxonázu, destičkový faktor aktivující acetylhydrolázu a glutathionperoxidázu), které zabráňují tvorbě prozánětlivých oxidovaných fosfolipidů v LDL částicích, podílejících se významně na tvorbě ateromu prostřednictvím neregulovaných zametačích (scavenger) receptorů. Naopak v přítomnosti trvající systémové zánětlivé reakce, tyto antioxidantní enzymy v HDL částicích mohou být inaktivovány, což vede k akumulaci oxidovaných lipidů a proteinů také v HDL, které získají prozánětlivý charakter, a ovlivní tak velmi

negativně reverzní transport cholesterolu blokováním výstupu cholesterolu z arteriální stěny cestou kazetového transportéru A-1 vázajícího ATP (ATP-binding cassette transporter A-1). Antiaterogenní charakter HDL částic vyžaduje tedy intaktní (neoxidovanou) molekulu ApoA-1. Při zánětlivé reakci myeloperoxidáza uvolňovaná z makrofágů ateromových lézí navodí chlorinaci a nitraci nejen ApoB, ale též Apo A-1. Takto pozměněný Apo A-1 na určitém tyrosinu jeho molekuly nejenže blokuje příznivý efekt HDL, tj. reverzní transport cholesterolu, ale též navodí škodlivou chemotaktickou aktivitu monocytů, které pak putují a hromadí se v místě ateromových lézí. Je to považováno za formu "chronické odpovědi akutní fáze" (Něco podobného jako mírné, ale trvalé zvýšení bazální hodnoty CRP). Na tomto podkladě byl vypracován laboratorní test (HDL inflammatory index), diagnostikující tuto patologickou situaci. Spočívá v porovnání chemotaktické aktivity monocytů bez přidání (index = 1,0) a po přidání testovaného HDL. Index > 1 svědčí pro prozánětlivý charakter, index < 1 ukazuje na protizánětlivý charakter. V jedné klinické studii (viz Ansell et al.) u skupiny pacientů s prokázanou chronickou kardiovaskulární chorobou, ale se zvýšeným HDL cholesterolem, měl tento index průměrnou hodnotu $1,28 \pm 0,29$, zatímco kontrolní skupina $0,35 \pm 0,11$. Nové poznatky o funkci HDL nabízejí též možnost nových přístupů k léčení aterosklerotických stavů. Pokusy na laboratorních myších ukazují, že aplikace tzv. apoA-1 mimetického peptidu (D-F4) zlepšuje aterosklerotické léze.

Jaroslav Masopust