

Zmeny v lipoproteínovom spektre pri končatinovo-cievnej ischemickej chorobe

S. Oravec, A. Dukát, P. Gavorník, M. Čaprnda, O. Reinoldová

II. interná klinika Lekárskej fakulty UK Bratislava, Slovenská republika, prednosta prof. MUDr. Andrej Dukát, CSc., FESC

Súhrn: Metóda delenia lipoproteínov na polyakrylamidovom géli Lipoprint LDL systém kvantifikuje neaterogénne a aterogénne lipoproteíny plazmy, včítane malých denzných LDL, silne aterogénnych lipoproteínov. Podľa prevahy neaterogénnych alebo aterogénnych lipoproteínov v lipoproteínovom spektre metóda identifikuje neaterogénny lipoproteínový profil fenotyp A a aterogénny lipoproteínový profil fenotyp B. Prínosom metódy je upozornenie na existenciu aterogénneho lipoproteínového profilu fenotyp B u 80 % pacientov s končatinovo-cievnu ischemickou chorobou, ale aj na jestvovanie kontrolnej podskupiny normolipemikov s aterogénnym lipoproteínovým profilom (7 % probandov kontrolnej skupiny). Ide o rizikovú populáciu. Možnosti identifikácie týchto „rizikových normolipemikov“ sú zatiaľ obmedzené.

Kľúčové slová: aterogénne lipoproteíny – aterogénny vs neaterogénny lipoproteínový profil

Changes in lipoprotein spectrum in patients with the diagnosis of extremity-vascular ischemic disease

Summary: New method of lipoprotein determination on polyacrylamid gel with Lipoprint LDL system quantifies non atherogenic and atherogenic plasma lipoproteins, including small dense LDL, the potent atherogenic lipoprotein subpopulations. According to majority of non atherogenic versus atherogenic lipoprotein in the whole lipoprotein spectrum, this method distinguishes a non atherogenic lipoprotein profile phenotype A from an atherogenic lipoprotein profile phenotype B. Definitely, the contribution of this method is focusing on the atherogenic lipoprotein profile phenotype B in 80% of patients with an extremity-vascular ischemic disease and on the existence of control subgroup of normolipemic subjects with an atherogenic lipoprotein profile (7% of probands of control group). These persons represent a risk population. Till now, the facilities for identifying of these “normolipemic persons at risk” are limited.

Key words: atherogenic lipoproteins – atherogenic vs non atherogenic lipoprotein profile

Úvod

V ostatnom čase nanovo narastá záujem lipidológov a klinických pracovníkov o identifikovanie lipoproteínových entít v lipoproteínovom spektre plazmy, ktorých prítomnosť v relevantných množstvách poškodzuje endotelové bunky, navodzuje dysfunkciu endotelia a spolu iniciuje spustenie multifaktoriálneho procesu degeneratívnych zmien v cieve, čoho dôsledkom je vznik ateromatóznych cievnych plakov. Ide o aterogénne lipoproteíny [1]. Ich početné zastúpenie v plazme charakterizuje lipoproteínového spektrum, fenotyp B [5,6]. V ňom sa nachádzajú malé denzné lipoproteíny nízkej hustoty (mdLDL) vo zvýšených koncentráciách a spoluúčastnia sa pri vzniku ischemického cievneho poškodenia [2–4]. Pri nízkom zastúpení aterogénnych lipoproteínov v lipoproteínovom spektre dostávame obraz neaterogénneho lipoproteínového profilu, fenotyp A [5,6].

Míľnikom v analýze a využitia v diagnostike porúch metabolizmu lipoproteínov sa stala elektroforetická metóda delenia lipoproteínov na polyakrylamidovom géli (PAGE), systémom Lipoprint LDL [7–10]. Umožňuje analyzovať 12 lipoproteínových subpopulácií: VLDL, IDL 1–3, LDL 1–7, HDL.

Elektroforéza lipoproteínov

- kvantitatívne vyhodnocuje:
- a) aterogénne (VLDL, IDLc IDLb a LDL 3–7, tzv. malé denzné LDL)

- b) neaterogénne lipoproteínové entity (IDLa, HDL)
- c) lipoproteíny s neistou aterogenitou (LDL 1–2)
- určuje neaterogénny vs aterogénny lipoproteínový profil, fenotyp A a fenotyp B

Aterogénny lipoproteínový profil je charakterizovaný prítomnosťou aterogénnych lipoproteínov veľmi nízkej hustoty (VLDL), intermediárnej hustoty (IDLc a IDLb) a malých denzných

Tab. 1. Malé denzné LDL.

Malé denzné LDL sú viac aterogénne pre [2,3]:

- znížené rozpoznávanie LDL-receptormi (konfiguračné zmeny Apo B) →
- zvýšená pohotovosť k oxidácii a acetylácii →
- oxid-LDL → uvoľňovanie pro-zápalových cytokínov → apoptóza svalových buniek
- oxid-LDL → uvoľňovanie metaloproteináz → odbúravanie kolagénu
- oxid-LDL → zvýšená pohotovosť k vylňovaniu makrofágami (scavenger-receptor) → stimulácia tvorby penových buniek
- ľahšie vnikanie do subendoteliálneho priestoru a vytváranie cholesterolových depozít

lipoproteínov nízkej hustoty (mdLDL) vo vysokých koncentráciách. V prípade tzv. malých denzných LDL (tab. 1), „small dense LDL“, ide o silne aterogénne subpopulácie LDL [1], ktoré migrujú v oblasti LDL 3–7. Ako ich názov naznačuje, sú menšie, s priemerom menším než 26,5 nm, resp. 265 Angströmov a flotujú v hustotnom rozmedzí $d = 1,048\text{--}1,065\text{ g/ml}$, t.j. vyššom než LDL 1, LDL 2. Na deliacom polyakrylamidovom géli (PAG) ich možno identifikovať ako jemné pásy na anodickej strane gélu, hneď za HDL frakciou, ktorá putuje na čele delených lipoproteínov.

Pacienti a metódy

V našej klinickej štúdii bolo vyšetrených 100 pacientov s novozistenou, klinicky manifestnou diagnózou končatinovo-cievnej ischemickej choroby (KICH). Súbor tvorilo 55 mužov a 45 žien, (priemerný vek žien $52,5 \pm 14,0$, priemerný vek mužov $56,0 \pm 11,0$) v kaudikálnom štádiu C2a, proximálny typ (AP), prvé štádium (P1) s dyslipidémiou. Pacienti boli exfajčiari.

Diagnostika ochorenia sa vykonala na základe anamnézy, základného a funkčného fyzikálneho vyšetrenia (polohový námahový test podľa Rat-schowa v modifikácii podľa Linhartu).

Z pomocných vyšetrení sa určoval členovo-brachiálny index [11,12].

V plazme sa testovala koncentrácia celkového cholesterolu (TC), triacylglycerolov (TAG), určilo kvantitatívne zastúpenie aterogénnych a neaterogénnych lipoproteínov a fenotyp lipoproteínového profilu: neaterogénny fenotyp A vs aterogénny fenotyp B.

Kontrolnú skupinu tvorilo 150 normolipemických probandov bez klinických a laboratórných známk ochorenia kardiovaskulárneho systému.

Krv sa odobrala po 12-hodinovom lačnení a získala sa EDTA- K_2 plazma, ktorá sa použila na analýzu biochemických parametrov.

Celkový cholesterol sa analyzoval enzymatickou metódou CHOD-PAP a stanovila sa jeho koncentrácia v plazme (Roche, SRN), triacylglyceroly sa analyzovali enzymatickou metódou a stanovila ich koncentrácia v plazme (Roche, SRN).

K určeniu lipoproteínového profilu sa použil System Lipoprint LDL, firma Quantimetrix, CA, USA, ktorý simultánne analyzoval 12 lipoproteínových tried a ich subpopulácií. Koncentrácia lipoproteínov systémom Lipoprint LDL sa vyjadrila obsahom cholesterolu v jednotlivých lipoproteínových triedach, resp. entitách: napr. VLDL-

-cholesterol. Prínosom metódy je kvantitatívne hodnotenie aterogénnych lipoproteínov plazmy, včítane malých denzných LDL (mdLDL), ktorú predstavujú subpopulácie LDL 3–7.

Prostanoidy: Prostacyklín (PGI_2), resp. jeho chemicky stabilná forma, 6-keto- $PGF_{1\alpha}$, a tromboxan A_2 (TxA_2), resp. jeho chemicky stabilná forma, tromboxan B_2 (TxB_2), sa analyzovali v plazme, metódou ELISA (DGR, USA).

V našej štúdii sa zaviedol výpočet Skóre Aterogénneho Rizika (SAR), čo predstavuje pomer neaterogénnych a aterogénnych lipoproteínov plazmy. SAR nad 10,8 deklaruje neaterogénne lipoproteínové spektrum, hodnota pod 9,8 aterogénne lipoproteínové spektrum. Hodnota medzi 9,8–10,8 je interval šedej zóny.

K štatistickému vyhodnoteniu nameraných hodnôt sa použil nepárový Studentov t-test.

Cieľ práce

Zmapovať zastúpenie aterogénnych lipoproteínov, určiť fenotyp lipoproteínového profilu u pacientov s diagnózou končatinovo-cievnej ischemickej choroby (KICH) a analýzou prostanoidov v plazme hodnotiť integritu cievneho endotelu.

Tab. 2. Pacienti s KICH.

	Chol (mmol/l ± SD)	TAG	VLDL	LDL ₁₂	LDL ₃₇	LDL	HDL	PGI ₂ (pg/ml ± SE)	TxA ₂	PG/Tx	Skóre
KICH (neaterog. profil, n = 20)	5,37 ± 0,95	1,81 ± 0,51	0,86 ± 0,26	1,82 ± 0,54	0,10 ± 0,03	3,18 ± 0,82	1,33 ± 0,29	3 174 ± 364	872 ± 70	3,9 ± 1,7	17,4 ± 6,5
KICH (aterog. profil, n = 80)	5,28 ± 1,28	2,31 ± 1,18	0,98 ± 0,39	1,52 ± 0,50	0,46 ± 0,34	3,09 ± 0,99	1,18 ± 0,32	3 305 ± 199	963 ± 94	4,2 ± 2,0	4,6 ± 4,0
spriemerované hodnoty: neatero- a aterog- podskupiny											
KICH (celkový počet n = 100)	5,29 ± 1,21	2,21 ± 1,05	0,96 ± 0,37	1,58 ± 0,51	0,39 ± 0,28	3,11 ± 0,96	1,21 ± 0,31	3 284 ± 232	948 ± 89	4,1 ± 1,9	7,2 ± 4,5
neat. vs at.		p < 0,01		p < 0,05		p < 0,0001		p < 0,0001			
aterogénny 80 % vs neaterogénny 20 %											

Zastúpenie aterogénneho lipoproteínového profilu u ischemickej choroby dolných končatín je 80,0 %.

Tab. 3. Kontrolná skupina.

	Chol (mmol/l ± SD)	TAG	VLDL	LDL ₁₂	LDL ₃₇	LDL	HDL	PGI ₂ (pg/ml ± SE)	TxA ₂	PG/Tx	Skóre
kontrola (neaterog. profil, n = 140)	4,28 ± 0,60	1,15 ± 0,39	0,60 ± 0,16	1,29 ± 0,38	0,03 ± 0,003	2,31 ± 0,53	1,35 ± 0,32	5 194 ± 604	1 277 ± 107	4,4 ± 2,7	37,9 ± 19,7
kontrola (aterog. profil, n = 10)	4,25 ± 0,54	1,44 ± 0,40	0,68 ± 0,14	1,16 ± 0,24	0,22 ± 0,08	2,24 ± 0,36	1,32 ± 0,31	2 467 ± 384	868 ± 362	4,1 ± 1,6	6,0 ± 2,0
sprimerované hodnoty: neatero- a aterog. podskupiny											
kontrola (celkový počet n = 150)	4,27 ± 0,60	1,17 ± 0,39	0,61 ± 0,16	1,28 ± 0,37	0,04 ± 0,004	2,30 ± 0,52	1,34 ± 0,32	4 967 ± 589	1 243 ± 124	4,4 ± 2,6	35,8 ± 18,5
neat. vs at.	p < 0,05		p < 0,0001				p < 0,0001				
neaterogénny 93,3 % vs aterogénny 6,7 %											

Vysoko signifikantný rozdiel ($p < 0,0001$) v koncentrácii malých denzných LDL (LDL3-7) odlišuje aterogénny lipoproteínový profil od neaterogénneho profilu u pacientov s končatinovo-cievnu ischemickou chorobou, ale aj v kontrolnej skupine zdravých probandov.

Tab. 4. Hodnoty biochemických parametrov, kontrolná skupina vs pacienti s končatinovo-cievnu ischemickou chorobou.

	Chol (mmol/l ± SD)	TAG	VLDL	LDL₁₂	LDL₃₇	LDL	HDL	PGI₂ (pg/ml ± SE)	TxA₂	PG/Tx	Skóre
kontrola (n = 150)	4,27 ± 0,60	1,17 ± 0,39	0,61 ± 0,16	1,28 ± 0,37	0,04 ± 0,004	2,30 ± 0,52	1,34 ± 0,32	4 967 ± 589	1 243 ± 124	4,4 ± 2,6	35,8 ± 18,5
KICH (n = 100)	5,29 ± 1,21	2,21 ± 1,05	0,96 ± 0,37	1,58 ± 0,51	0,39 ± 0,28	3,11 ± 0,96	1,21 ± 0,31	3 284 ± 232	948 ± 89	4,1 ± 1,9	7,2 ± 4,5
kontr. vs dg.	<————— p < 0,0001 —————>						p < 0,001	p < 0,01	p < 0,02	n.s.	p < 0,0001

Rozdiely v zložení lipoproteínov u pacientov s končatinovo-cievnu ischemickou chorobou oproti kontrolnej skupine sú štatisticky vysoko signifikantné ($p < 0,0001$), pre HDL je rozdiel koncentrácií štatisticky signifikantný pri $p < 0,001$.

Výsledky

Hodnoty biochemických parametrov neaterogénny vs aterogénny lipoproteínový profil, u pacientov s KICH popisuje tab. 2 a u kontrolnej skupiny tab. 3.

Vysoko signifikantný rozdiel ($p < 0,0001$) v koncentrácii malých denzných LDL (LDL3-7) odlišuje aterogénny lipoproteínový profil od neaterogénneho profilu u pacientov s končatinovo-cievnu ischemickou chorobou, ale aj v kontrolnej skupine zdravých probandov (tab. 4).

Rozdiely v zložení lipoproteínov u pacientov s končatinovo-cievnu ischemickou chorobou oproti kontrolnej skupine sú štatisticky vysoko signi-

fikantné ($p < 0,0001$), pre HDL je rozdiel koncentrácií štatisticky signifikantný pri $p < 0,001$.

Diskusia

Nová diagnostická metóda elektroforetického delenia lipoproteínov na polyakrylamidovom géli identifikovala aterogénny lipoproteínový profil u 80 % pacientov s končatinovo-cievnu ischemickou chorobou (KICH), čo je v súlade s klinickým obrazom silnej aterogénnej aktivity u vyšetrovaných osôb s KICH [13,14]. Vysoko signifikantné rozdiely medzi kontrolnou skupinou a skupinou pacientov s KICH zaznamenávame pri

všetkých lipidových a lipoproteínových parametroch.

Metóda prekvapivo odhaľuje aj prítomnosť aterogénneho profilu lipoproteínov u kontrolnej skupiny zdravých probandov a rozdeľuje kontrolnú skupinu na dve podskupiny:

- a) s aterogénnym
- b) s neaterogénnym lipoproteínovým profilom

To, čo ich odlišuje, je rozdiel v koncentrácii mLDL, ktorý je vysoko štatisticky signifikantný ($p < 0,0001$). Temer 7 % podskupina zdravých probandov kontrolnej skupiny s aterogénnou konšteláciou lipoproteínov dáva podnet k sprís-

neniu kritérií výberu probandov pri tvorbe kontrolnej skupiny.

V predkladanej štúdii sa analyzovala koncentrácia prostacyklínu (PGI_2) a tromboxanu A_2 (TxA_2) v plazme, ako index miery dysfunkcie endotelu [15]. Intaktný endotel je charakterizovaný neporušenou endotelovou sekréciou prostanooidov, vyjadrenou pomerom molárnej koncentrácie $\text{PGI}_2/\text{TxA}_2$, a predstavuje hodnotu 1,5 a vyššiu. Hodnoty koncentrácie prostacyklínu a tromboxanu kontrolnej skupiny a pacientov s KICH sú zhrnuté v tab. 2–4. Endotelová sekrécia prostanooidov u pacientov s KICH oproti kontrolnej skupine je znížená ($p < 0,01$, resp. $p < 0,02$) a potvrdzuje dysfunkciu endotelu u vyšetrovaných pacientov. Rovnakou mierou je porušená syntéza (a tým aj sekrécia) oboch prostanooidov: prostacyklínu aj tromboxanu, takže pomer $\text{PGI}_2/\text{TxA}_2 = 4,1$ u testovaných pacientov nie je signifikantne odlišný od pomeru prostacyklín/tromboxan = 4,4 u kontrolnej skupiny.

Ako ďalší parameter na testovanie aterogenity lipoproteínového profilu sme novo zaviedli „Skóre Aterogénneho Rizika“ (SAR). Ide o index, ktorý porovnáva množstvo neaterogénnych a aterogénnych lipoproteínov v celom lipoproteínovom spektre. Ako vidieť v tab. 2–4, jeho informatívna hodnota je porovnateľná s testovanými sub-

populáciami LDL 3–7 = mdLDL. Ako sa uvádza v tab. 2–4, rozdiely v skóre aterogénneho rizika medzi aterogénnym a neaterogénnym lipoproteínovým profilom v skupine pacientov, ale aj v rámci kontrolnej skupiny: aterogénna vs neaterogénna subskupina, sú štatisticky vysoko signifikantné ($p < 0,0001$). Širšie použitie SAR v klinickej praxi vyžaduje ďalšie testovania v klinických štúdiách.

Literatúra

1. Superko HR. Lipoprotein subclasses and atherosclerosis. *Front Biosci* 2001; 6: D355–D365.
2. Berneis KK, Krauss RM. Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. *J Lipid Res* 2002; 43: 1363–1379.
3. Packard CJ. Triacylglycerol-rich lipoproteins and the generation of small dense low-density lipoprotein. *Biochem Soc Trans* 2003; 31: 1066–1069.
4. Shoji T, Hatsuda S, Tsuchikura S et al. Small dense low-density lipoprotein cholesterol concentration and carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2009; 202: 582–588.
5. Austin MA, King MC, Vranizan KM et al. Atherogenic lipoprotein phenotype. A proposed genetic marker for coronary heart disease risk. *Circulation* 1990; 82: 495–506.
6. Van J, Pan J, Charles MA et al. Atherogenic lipid phenotype in a general group of subjects. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131: 1679–1685.
7. Hoefner DM, Hodel SD, O'Brien JF et al. Development of a rapid quantitative method for LDL subfraction with use of the

Quantimetrix Lipoprint LDL system. *Clin Chem* 2001; 47: 266–274.

8. Oravec S. Nová laboratórno-medicínska pomoc v diagnostike dyslipoproteínmií a kardiovaskulárnych ochorení: Identifikácia LDL podskupín. *Med Milit Slov* 2006; 8: 28–32.

9. Oravec S. Identifikácia subpopulácií LDL triedy – Aktuálny prínos v diagnostike porúch metabolizmu lipoproteínov a ochorení kardiovaskulárneho systému. *Med Milit Slov* 2006; 8: 32–34.

10. Oravec S. Nové perspektívy v diagnostike porúch metabolizmu lipoproteínov – prínos v interpretácii výsledkov. *Med Milit Slov* 2007; 9: 42–45.

11. Gavorník P. Etiopatogenéza a nová klinicko-etiológicko-anatomicko-patologická (CEAP) klasifikácia končatinovej choroby. *Interní Med* 2010; 10: 115–123.

12. Gavorník P. Všeobecná angiológia. Angiologická propedeutika. Cievne choroby. Bratislava: Vydavateľstvo Univerzity Komenského 2001.

13. Hirsch AT, Haskal ZJ, Hertzner NR et al. ACC/AHA 2005 Guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47: 1239–1312.

14. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA et al. Inter-society consensus for the management of peripheral arterial disease. *Int Angiol* 2007; 26: 81–157.

15. Vakkilainen J, Mäkimattila S, Sepälä-Lindroos A et al. Endothelial dysfunction in men with small LDL particles. *Circulation* 2000; 102: 716–721.

doc. MUDr. Stanislav Oravec, CSc.

www.nspr.sk

e-mail: stanislavoravec@yahoo.com

Doručeno do redakce: 31. 5. 2010