



Laboratórna Diagnostika, XXVI, 1, 2021: 79–85

SÚLAD A NESÚLAD MEDZI ZÁKLADNÝMI UKAZOVATEĽMI LIPIDOVÉHO METABOLIZMU STANOVENÝMI RUTINNÝMI LABORATÓRNÝMI METÓDAMI A METÓDOU PROTÓNOVEJ NUKLEÁRNEJ MAGNETICKEJ REZONANČNEJ SPEKTROSKOPIE V NÁHODNE VYBRANEJ POPULAČNEJ VZORKE

Rácz, O.¹, Pella, D.², Bilá, E.³

¹Ústav patologickej fyziológie LF UPJŠ, Košice
²II. Kardiologická klinika, VÚSCH a LF UPJŠ, Košice

³Allmedical s. r. o. Košice

olliracz@gmail.com

SÚHRN

Protónová nukleárna magnetická rezonančná spektroskopie umožňuje meranie počtu častíc jednotlivých lipoproteínov a ich rozmer. Cieľom našej pilotnej štúdie bolo vyšetrenie náhodne vybranej skupiny probandov bez klinicky zjavných príznakov aterosklerotickej choroby srdca touto metódou a porovnanie výsledkov s hodnotami základného lipidového panelu meranými bežnými metódami. Výsledky korelačnej analýzy medzi výsledkami protónovej nukleárnej magnetickej rezonančnej spektroskopie a základnými ukazovateľmi lipidového metabolizmu potvrdili predpoklad o pridanej hodnote novej metódy vo vzťahu k ateroskleróze. Medzi vybranými parametrami výsledkov protónovej nukleárnej magnetickej rezonančnej spektroskopie a základnými ukazovateľmi lipidového metabolizmu bol významný nesúlad. Na základe počtu LDL častíc bolo 70 % probandov zaradených do horšej rizikovej triedy, ako na základe LDL cholesterolu. V prípade HDL bol nesúlad menej častý a približne polovica probandov bola zaradená do nižšej rizikovej skupiny podľa počtu častíc v porovnaní s HDL cholesterolom.

Kľúčové slová: Protónová nukleárna magnetická rezonančná spektroskopie; lipoproteíny; aterosklerotická choroba srdca

ABSTRACT

Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy makes measurement of individual lipoprotein particle number and size possible. The aim of our pilot study was the assessment of a randomly selected group of probands without clinically manifest symptoms of atherosclerotic cardiovascular with this method and the comparison of results with values of basic lipid parameters measured by routine laboratory methods. The correlation analysis between results of proton nuclear magnetic resonance spectroscopy and basic parameters of lipid metabolism confirmed our assumption about the added value of the new method in relation to atherosclerosis. There was a significant discordance between results of selected parameters of proton nuclear magnetic resonance spectroscopy and basic parameters of lipid metabolism. 70 % of probands were ranked into

worse risk classes according to LDL particle number as compared with the LDL cholesterol values. In case of HDL the discordance was less common and about half of the probands was ranked into a better risk class according to the particle number as compared with HDL cholesterol values.

Key words: Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy; lipoproteins; atherosclerotic cardiovascular disease

ÚVOD

Základnými ukazovateľmi rizika aterosklerotickej choroby srdca (ACHS¹) a úspešnosti jej liečby sú podľa spoločných odporúčaní Európskej aterosklerotickej spoločnosti a Európskej federácie laboratórnej medicíny (EAS, EFLM, Nordestgaard a kol., 2019) parametre lipidového metabolizmu – celkový cholesterol (TC), LDL cholesterol (LDLC), HDL cholesterol (HDL), triacylglyceroly (TAG) a počítaná hodnota nonHDL cholesterolu (NHDLC). Súčasné odporúčania EAS a EFLM uvádzajú aj meranie alebo výpočet remnantného cholesterolu, ale tento ukazovateľ

ešte nie je u nás bežne používaný. Uvedené základné parametre však dávajú len hrubý odhad rizika ACHS, pretože okrem TAG poskytujú len informáciu o koncentrácii cholesterolu v lipoproteínoch a nie o ich štruktúre a kauzálneho vzťahu k rozvoju aterosklerózy. V poslednej dobe základný panel bol rozšírený o niekoľko nových metód (Rácz a kol. 2012; Clouet-Foraison a kol., 2017; Huang, Wang, Shen, 2018; Tsimika a kol., 2018; Oravec a kol., 2019 a 2020 – Tab. 1). Patogenéza aterosklerózy je komplexná a pri hodnotení individuálneho rizika je potrebné brať zreteľ aj na iné činitele, z ktorých niektoré sú všeobecne známe epidemiologické údaje (vek, pohlavie, fajčenie, nedostatok pohybu, obezita, diabetes a mnohé iné), ďalšie sú výsledky objektívnych laboratórnych a zobrazovacích vyšetrovacích metód, z ktorých mnohé sú zároveň aj v príčinnej súvislosti s rozvojom aterosklerózy a klinicky manifestnými formami ACHS (Žák, 2002; Kamenský, Studenčan, 2019). Najnovšie k týmto je možné a potrebné pridať aj stanovenie mutácií a polymorfizmov génov a biomarkerov epigenetických pochodov (Tada a kol., 2020).

K novým perspektívnym metódam detailnej analýzy štruktúry lipoproteínov (čo súvisí s ich aterogenicitou) patrí protónová nukleárna magnetická rezonančná spek-

Tab. 1. Rozšírené a pokročilé ukazovatele lipidového metabolizmu vo vzťahu k ateroskleróze

Apoproteín B100	Bielkovina potrebná pre vznik častíc typu LDL a pre ich väzbu na LDL receptor. V jednej častici LDL je jedna molekula B100 a preto jej koncentrácia poskytuje informáciu aj o tom, aký je pomer malých denzných a veľkých LDL častíc.*
Lipoproteín(a)	Nefunkčná, ale aterogénna častica LDL s naviazanou bielkovinou podobnou plazminogénu. Koncentrácia Lp(a) je daná geneticky – je vysoká približne u 20% populácie.*
Apoproteín AI	Tvorí 70% bielkovín HDL. Preberá cholesterol od ABCA1 transportéra. Účast' na modelácii HDL. Aktivuje enzým LCAT, ktorý tvorí estery cholesterolu. ^a
Lipoproteínmi-asociovaná fosfolipáza A2 (LP-PLA2)	Enzým. Zápalový marker, aktivita súvisí s rizikom ruptúry aterosklerotického plaku. ^{a,b}
Stanovenie subfrakcií Lipoproteínov	Elektroforetické delenie modernými metódami poskytuje informáciu o pomere aterogénnych a neaterogénnych frakcií jednotlivých lipoproteínov. ^a
Analýza apoproteínov hmotnostnou spektroskopiou	Detailný obraz o štruktúre všetkých proteínov v jednotlivých lipoproteínoch. ^a

* – dnes už bežne používané ukazovatele, sú uvedené aj v odporúčaníach EAS a EFLM;

^a – používané vo vedeckých štúdiách a v experimentálnej medicíne; ^b – lontroverzné údaje o aterogenicitě

¹ Výraz používaný „Atherosclerotic cardiovascular disease (ACVS) v odporúčaníach EAS a EFLM z roku 2019. U nás používame stále výrazy „koronárna choroba srdca“ a „ischemická choroba srdca“

trokopia (PNMR). Metóda bola vyvinutá v poslednom desaťročí minulého storočia (Otvos a kol., 1991) a dnes pomocou sofistikovanej výpočtovej techniky umožňuje meranie počtu častíc jednotlivých lipoproteínov a ich rozmer (Otvos a kol., 2011; Cromwell a kol., 2007; El Harchaoui a kol., 2007; Monsonis-Centelles a kol., 2017; Aru a kol., 2017).

Cieľom našej pilotnej štúdie bolo stanovenie lipidových parametrov metódou PNMR u probandov bez klinických prejavov ACHS, súvislostí medzi klasickými parametrami metabolizmu a výsledkami PNMR metódy a výpočet súladu a nesúladu medzi týmito hodnotami a klasicky meranými koncentraciami LDLC, HDLC, NHDLC a TAG.

Súbor vyšetrených a metódy

Do pilotnej štúdie bolo zaradených 50 probandov bez klinických známk ACHS vyšetrených na ambulancii vnútorného lekárstva (vek 37–72 rokov, 38 mužov a 12 žien). Vyšetrenie počtu a rozmerov lipoproteínov PNMR bolo robené metódou INFAI NMR spectroscopic assay (Nemecko). V našej analýze sme hodnotili ukazovatele počet častíc VLDLP², LDLP, LLDLP, SLDLP a HDLP, LHDLP a SHDLP a rozmer častíc VLDLS, LDLS a HDLS.

TC, HDLC, priamo meraný LDLC a TAG boli analyzované certifikovanými komerčnými súpravami na automatických analyzátoroch. NHDLC bol počítaný ako rozdiel TC a HDLC. Súlad a nesúlad medzi koncentráciou LDLC a LDLP, NHDLC

Tab. 2. Základné ukazovatele lipidového metabolizmu

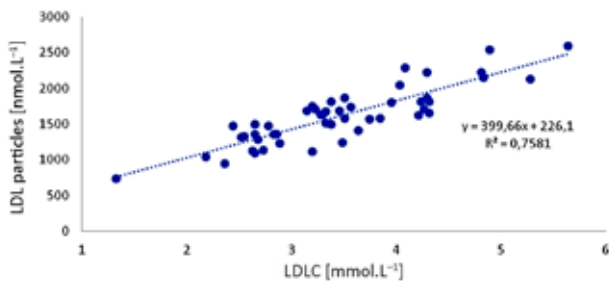
Koncentrácia [mmol·L ⁻¹]	TC	HDLC	LDLC	TAG	NHDLC
Priemer a smerodajná odchýlka	5,63 ± 1,01	1,49 ± 0,36	3,46 ± 0,86	1,71 ± 0,69	4,04 ± 0,94
Minimum–maximum	3,77–7,88	0,83–2,26	1,36–5,64	0,59–4,55	1,87–6,29
Distribúcia hodnôt Nízke/stredné/vysoké riziko	20/16/14 (20/32/28%)	22/22/6 (44/44/12%)	6/30/14 (12/60/28%)	27/13/10 (54/26/20%)	14/14/22 (28/28/44%)

Tab. 3. Počet a rozmer lipoproteínov na základe analýzy PNMR

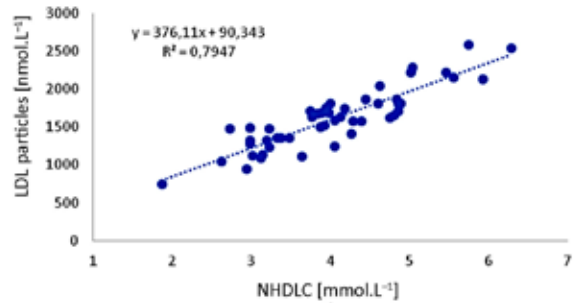
Počet častíc VLDL a LDL [nmol·L ⁻¹]	VLDLP	LDLP	LLDLP	SLDLP
Priemer a smerodajná odchýlka	5,44 ± 4,68	1610 ± 395	918 ± 226	698 ± 325
Minimum-maximum	1,40–23,20	740–2590	461–1407	152–1527
Počet častíc HDL [μmol·L ⁻¹]	HDLP	LHDLP	SHDLP	–
Priemer a smerodajná odchýlka	40,4 ± 5,01	5,79 ± 3,60	35,2 ± 6,05	–
Minimum-maximum	22,8–52,1	2,80–16,8	20,9–43,9	–
Rozmer častíc [nm]	VLDLS	LDLS	HDLS	–
Priemer a smerodajná odchýlka	49,8 ± 4,65	21,0 ± 0,46	8,79 ± 0,53	–
Minimum-maximum	41,1–64,3	20,1–21,8	8,2–10,4	–

Vysvetlivky: Podľa výrobcu horná hranica počtu častíc LDLP je 1300 nmol·L⁻¹; SLDLP častíc 1000 nmol·L⁻¹; HDL častíc 38 μmol·L⁻¹; rozmeru LDL častíc 20,5 nm; HDL častíc 9,0 nm. Pre ostatné parametre zatiaľ nie sú určené hodnoty nízkeho a vysokého rizika manifestácie ACHS

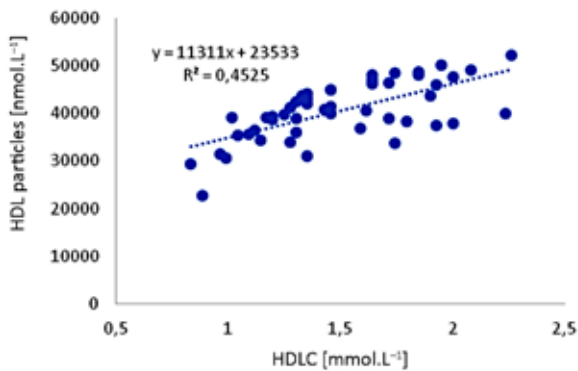
² „P“ na konci skratky znamená počet častíc, „S“ rozmer. Popis v zozname skratiek.



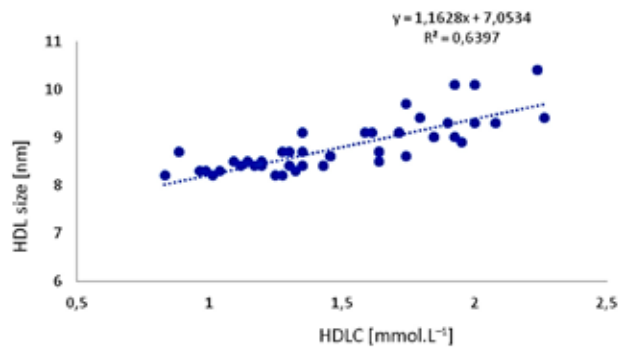
Obr. 1. Súvislosť medzi koncentráciou LDLC a počtom častíc LDLP



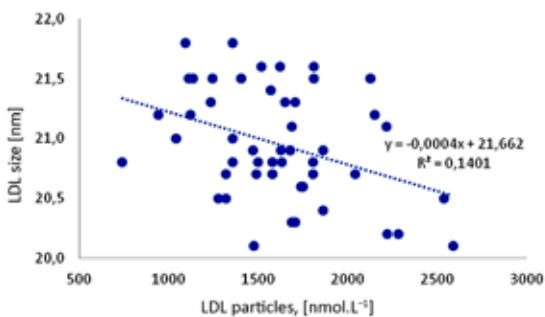
Obr. 2. Súvislosť medzi koncentráciou NHDLC a počtom častíc LDLP



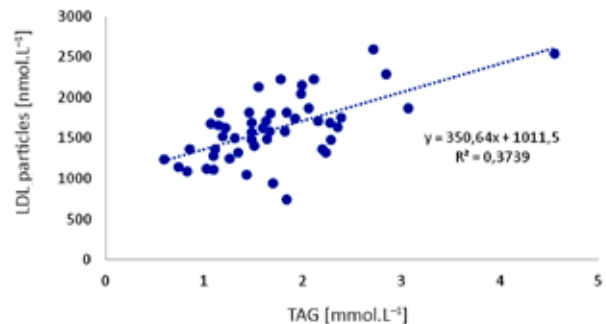
Obr. 3. Súvislosť medzi koncentráciou HDLC a počtom častíc HDLP



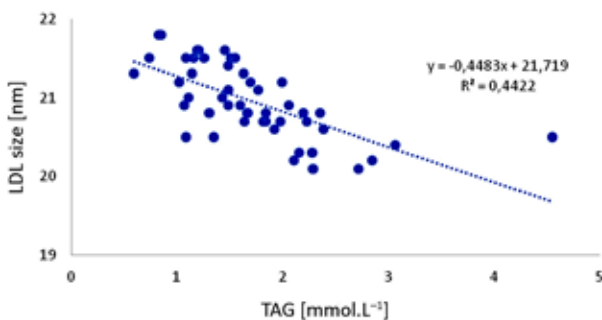
Obr. 4. Súvislosť medzi koncentráciou HDLC a rozmerom častíc HDLS



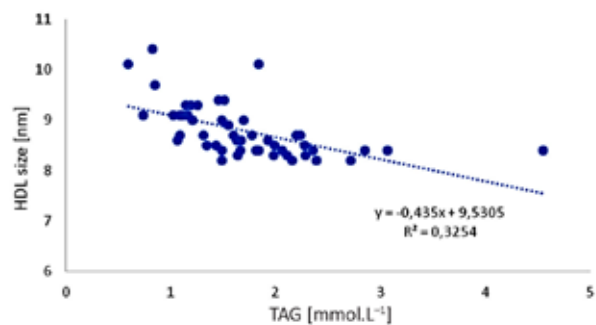
Obr. 5. Súvislosť medzi počtom a rozmerom častíc LDL



Obr. 6. Súvislosť medzi koncentráciou triacylglycerolov a počtom častíc LDLP



Obr. 7. Súvislosť medzi koncentráciou triacylglycerolov a rozmerom častíc LDL



Obr. 8. Súvislosť medzi koncentráciou triacylglycerolov a rozmerom častíc HDL

Tab. 4. Súlad a nesúlad medzi zaradením vyšetrených do rizikových tried

SÚLAD	LDLC/LDLP	HDLC/HDLP
Nízky/nízky	2 (4%)	17 (34%)
Stredný/stredný	1 (2%)	6 (12%)
Vysoký/vysoký	12 (24%)	3 (6%)
SÚLAD SPOLU	15 (30%)	26 (52%)
NESÚLAD	LDLC/LDLP	HDLC/HDLP
Nízky/stredný	7 (14%)	3(6%)
Stredný/nízky	0	17 (34%)
Stredný/vysoký	10 (20%)	1 (2%)
Vysoký/stredný	0	1 (2%)
Nízky/vysoký	18 (36%)	1 (2%)
Vysoký/nízky	0	1 (2%)
NESÚLAD SPOLU	35 (70%)	24 (48%)

a LDLP a medzi HDLC a HDLP bol hodnotený na základe zaradenia hodnôt analytov ako „nízke, stredne vysoké a vysoké riziko“ podľa medzinárodných odporúčaní a podľa údajov poskytovateľa PNMR metódy.

VÝSLEDKY

Hodnoty základných parametrov lipidového metabolizmu vyšetreného súboru sú uvedené v Tab. 2. a výsledky PNMR analýzy v Tab. 3.

Korelačnou analýzou sme našli vysoko signifikantné súvislosti medzi klasickými parametrami a výsledkami PNMR (LDLC a NHDLC oproti počtu častíc LDLP ($r = 0,87$ a $0,89$, $p < 0,001$, Obr. 1 a 2; HDLC a HDLP a HDLS ($r = 0,67$ a $0,80$, $p < 0,001$, Obr. 3 a 4) a jednu slabšiu nepriamu medzi LDLP a LDLS ($r = -0,37$; $p < 0,05$; Obr. 5).

Metóda PNMR neposkytuje informáciu o koncentrácii TAG, ale korelačnou analýzou sme našli signifikantnú priamu súvislosť medzi TAG a LDLP a nepriame medzi TAG a LDLS a HDLS ($r = 0,61$, $-0,64$ a $-0,57$; všetky $p < 0,01$ (Obr. 6–8). Výsledky korelačnej analýzy súvislostí medzi ostatnými základnými lipidovými a PNMR parametrami neboli signifikantné.

Súlad a nesúlad medzi výsledkami klasických parametrov a výsledkami PNMR sú v Tab. 4. Súlad medzi koncentráciou cholesterolu LDL a počtom častíc LDL bol len

30 % a 70 % vyšetrených bolo zaradených o jednu alebo dve triedy rizika horšie. Súlad medzi koncentráciou cholesterolu HDL a počtom častíc HDL bol 52 % a najviac vyšetrených s nesúladom (34 %) boli na základe hodnotenia častíc o triedu nižšie, ako na základe koncentrácie HDL cholesterolu.

DISKUSIA

Ukazovatele základného lipidového panelu sú jednoznačne dokázané rizikové faktory rozvoja ACHS a pre základnú informáciu budú ešte dlho využívané, napriek tomu, že neposkytujú informáciu o štruktúre a aterogenicite lipoproteínov. Výsledkom je to, že pomerne veľký počet ľudí s hodnotami základného panelu v oblasti vysokého rizika nemajú klinické prejavy ACHS a na druhej strane akútne formy ACHS sa môžu objaviť aj u tých, ktorí majú hodnoty základného panelu v norme.

Nesúlad medzi rizikom ACHS a jej klinickou manifestáciou je možné riešiť dvoma spôsobmi:

1. Individuálnym komplexným hodnotením reziduálneho rizika na základe analýzy všetkých známych činiteľov rozvoja aterosklerózy a použitím vhodných metód na ich objasnenie.
2. Rozšírením panelu biochemických ukazovateľov rizika, z ktorých niektoré sú už dnes súčasťou rutinného vyšetrenia probandov s vysokým rizikom (predovšetkým ApoB100 a lipoproteín(a)).

Zavedeniu pokročilých ukazovateľov metabolizmu lipidov, ktoré podľa údajov výskumu poskytujú reálny obraz o štruktúre a aterogenicite lipoproteínov do systému bráni:

- nedostatok relevantných údajov o ich pridanej hodnote pri hodnotení rizika ACHS,
- chýbanie certifikovaných a validovaných metód na ich meranie a
- v mnohých prípadoch ich vysoká cena.

V prípade PNMR tieto negatívne faktory sú dnes ešte prítomné, ale napriek tomu je jasné, že ide o perspektívnu metódu, pretože poskytuje detailný obraz o štruktúre lipoproteínov.

Naša pilotná štúdia tento názor potvrdzuje, a to predovšetkým výsledky korelačnej analýzy, konkrétne:

Korelácie medzi koncentráciou LDLC, NONHDLC, HDLC a počtom častíc LDLP a HDLP potvrdzujú správnosť

výsledkov PNMR (Obr. 1–3). Nepriama súvislosť medzi LDLC a rozmerom častíc (Obr. 5) potvrdzuje názor o úlohe malých denzných častíc v patogeneze aterosklerózy. Za významné považujeme súvislosti medzi koncentráciou triacylglycerolov a niektorými ukazovateľmi meranými PNMR (Obr. 6–8), pretože jeden z nedostatkov základného panelu je to, že poskytuje len informáciu o koncentrácii cholesterolu v jednotlivých lipoproteínoch, kým TAG je len súhrnom koncentrácie tejto látky vo všetkých častiach.

Výsledky častého nesúladu medzi zaradením vyšetrených do jednotlivých rizikových kategórií (oveľa viac horšie zaradených podľa PNMR oproti klasickým hodnotám LDL) je predčasné hodnotiť, pretože neexistuje klinická štúdia o tom, či je prísnejšie hodnotenie na základe počtu častíc znamená skutočne vyššie riziko manifestácie ACHS ako hodnota LDLC a NHDLC.

ZÁVER

Metóda PNMR poskytuje informáciu o počte a rozmeroch jednotlivých častíc lipoproteínov a preto z hľadiska objasnenia patobiológie aterosklerózy má oveľa väčšiu výpovednú hodnotu oproti základným parametrom lipidového metabolizmu, ktoré merajú len celkovú koncentraciu triacylglycerolov vo všetkých časticiach a cholesterolu v jednotlivých základných lipoproteínoch. Pred zavedením PNMR do bežného vyšetrovacieho algoritmu stanovenia rizika ACHS je potrebné pomocou klinických štúdií objasniť vzťah jednotlivých parametrov k ostatným rizikovým faktorom a ku klinickým prejavom a koncovými východiskami choroby. Je potrebné skúmať príčinu a podstatu nesúladu medzi zaradením vyšetrených do jednotlivých rizikových skupín na základe výsledkov rôznych (nie len základných a PNMR) metód. Na základe týchto štúdií bude možné v neďalekej budúcnosti vypracovať jednoduchý a pre každodennú prax zrozumiteľný algoritmus hodnotenia rizika ACHS s vyššou výpovednou hodnotou, ako sú súčasné odporúčania.

LITERATÚRA

1. **Aru, V. et al. (2017):** Quantification of lipoprotein profiles by nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate data analysis. *TrAC—Trends in Analytical Chemistry*. doi: 10.1016/j.trac.2017.07.009.
2. **Clouet-Foraion, N. et al. (2017):** Advanced lipoprotein testing for cardiovascular diseases risk assessment: A review of the novel approaches in lipoprotein profiling. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. doi: 10.1515/cclm-2017-0091.
3. **Cromwell, W. C. et al. (2007):** LDL particle number and risk of future cardiovascular disease in the Framingham Offspring Study—Implications for LDL management. *Journal of Clinical Lipidology*. doi: 10.1016/j.jacl.2007.10.001.
4. **El Harchaoui, K. et al. (2007):** Value of Low-Density Lipoprotein Particle Number and Size as Predictors of Coronary Artery Disease in Apparently Healthy Men and Women. The EPIC-Norfolk Prospective Population Study. *Journal of the American College of Cardiology*. doi: 10.1016/j.jacc.2006.09.043.
5. **Huang, F., Wang, K., Shen, J. (2020):** Lipoprotein-associated phospholipase A2: The story continues. *Medicinal Research Reviews*. doi: 10.1002/med.21597.
6. **Kamenský, G., Studenčan, M. (2019):** Štandardný diagnostický a terapeutický postup na komplexný manažment pacienta so stabilnou koronárnou chorobou srdca. Available at: https://www.mzsr.sk/Zdroje?/Sources/dokumenty/SDTP/standardy/1-5-2020/Kardiologia-Komplexny_manazment_pacienta_so_stabilnou_koronarnou_choroba_srdca.pdf.
7. **Monsonis Centelles, S. et al. (2017):** Toward Reliable Lipoprotein Particle Predictions from NMR Spectra of Human Blood: An Interlaboratory Ring Test. *Analytical Chemistry*. doi: 10.1021/acs.analchem.7b01329.
8. **Nordestgaard, B. G. et al. (2020):** Quantifying atherogenic lipoproteins for lipid-lowering strategies: Consensus-based recommendations from EAS and EFLM. *Atherosclerosis*. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2019.12.005.
9. **Oravec, S. et al. (2019):** Small dense LDL—An important part of the atherogenic lipoprotein profile in individuals with impaired metabolism of lipoproteins. Comparison of two analytical procedures. *Neuroendocrinology Letters*.
10. **Oravec, S. et al. (2020):** Malé denzné LDL u osôb s poruchou metabolizmu lipoproteínov. *Laboratórna Diagnostika*, 25(2), pp. 43–46.
11. **Otvos, J. D., Jeyarajah, E. J., Bennett, D. W. (1991):** Quantification of plasma lipoproteins by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Clinical Chemistry*. doi: 10.1093/clinchem/37.3.377.
12. **Otvos, J. D. et al. (2011):** Clinical implications of discordance between low-density lipoprotein cholesterol and parti-

cle number. *Journal of Clinical Lipidology*. doi: 10.1016/j.jacl.2011.02.001.

13. **Rácz, O. et al. (2009):** Apoproteín B100 – významný krok k presnejšej diagnostike rozvoja aterosklerózy a rizika manifestácie jej následkov – 1. časť. *Labor Aktuell*, 8(2), pp. 17–21.

14. **Tada, H., Takamura, M., Kawashiri, M. aki (2020):** What is the mechanism of genetic contributions to the development of atherosclerosis? *Atherosclerosis*. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2020.05.006.

15. **Žák, A. (2002):** Poruchy metabolizmu lipidů a lipoproteinů. In **Zima, T. (ed.):** *Laboratorní diagnostika*. Praha: Galén, pp. 125–159.

ZOZNAM SKRATIEK	
ACHD	Aterosklerotická choroba srdca
APOB100	Apoproteín B100
EAS	Európska aterosklerotická spoločnosť
EFLM	Európska federácia laboratórnej medicíny
HDL	Lipoproteín o vysokej hustote
HDLC	koncentrácia cholesterolu v HDL
HDLP, LHDL, SHDL	Počet častíc HDL, počet veľkých (L) a malých (S) častíc HDL
HDLS	Rozmer častíc HDL
LP-PLA2)	Lipoproteínmi-asociovaná fosfolipáza A2
LDL	Lipoproteín o nízkej hustote
LDLC	koncentrácia cholesterolu v LDL
LDLP, LLDLP, SLDLP	Počet častíc LDL, počet veľkých (L) a malých (S) častíc LDL
LDLS	Rozmer častíc LDL
NONHDLC	Koncentrácia cholesterolu v lipoproteínoch okrem HDL častíc
PNMR	Protónová nukleárna magnetická rezonancia
TAG	Triacylglyceroly
TC	Celkový cholesterol
VLDL	Lipoproteín o veľmi nízkej hustote
VLDLP	Počet častíc VLDL
VLDLS	Rozmer častíc VLDL