

## STANOVENIE FRAKCIÍ HDL-CHOLESTEROLU PRI ISCHEMICKEJ CHOROBE SRDCA

Hubková B.<sup>1</sup>, Birková A.<sup>1</sup>, Mašlanková J.<sup>1</sup>, Hertelyová Z.<sup>2</sup>, Tóth Š.<sup>3</sup>, Pella D.<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>Ústav lekárskej a klinickej biochémie UPJŠ LF

<sup>2</sup>Centrum klinického a predklinického výskumu MEDIPARK UPJŠ LF

<sup>3</sup>SLOVACRIN UPJŠ LF

<sup>4</sup>II. Kardiologická klinika UPJŠ LF a VÚSCH, a.s.

**Cieľ** Cieľom predloženej práce je analyzovať zmeny v subfrakciách lipoproteínov vysokej hustoty u pacientov s podozrením na ischemickú chorobu srdca, čo rozširuje možnosti určenia kardiovaskulárneho rizika.

**Materiál a Metodika** Frakcionácia HDL častíc a kvantifikácia cholesterolu v príslušných subfrakciách bola vykonaná elektroforetickou metódou Lipoprint®. Výsledky boli korelované s nálezom selektívnej koronárnej angiografie (SKG).

**Výsledky** Priemerné koncentrácie cholesterolu vo veľkých HDL 2 u pacientov bez pozitívneho nálezu pri SKG boli štatisticky signifikantne vyššie než u pacientov s pozitívnym nálezom ( $0,133 \pm 0,095$  mmol/l resp.  $0,099 \pm 0,068$  mmol/l,  $p = 0,041^*$ ). V ostatných subfrakciách nebol zaznamenaný štatisticky signifikantný rozdiel medzi pacientami vzhľadom ku nálezu pri SKG.

**Záver** Stanovenie HDL-cholesterolu je pri rozhodovaní procese kardiológa nepostačujúce. Aterogénna dyslipidémia posúva distribúciu HDL častíc smerom k malým denzným HDL. Bez ohľadu na to, či je táto skutočnosť príčinou alebo dôsledkom aterogenicity, metóda Lipoprint® ponúka nástroj pre personalizovaný prístup pri manažmente pacienta.

**Kľúčové slová:** HDL, cholesterol, heterogenita, subfrakcia, ischemická choroba srdca

### Úvod

Choroby obehového systému boli a sú aj v období pandémie ochorenia COVID-19 najčastejšou príčinou úmrtí. Podľa dostupných štatistických údajov zomrelo na Slovensku v rokoch 2016 až 2020: 52 351 – 53 914 – 54 293 – 53 234 – 59 089 obyvateľov [26]. Z týchto celkových úmrtí na choroby obehovej sústavy (kapitola IX, I00-I99 podľa Medzinárodnej klasifikácie chorôb MKCH-10-SK) podľa hlo v spomínaných rokoch postupne 25 240 – 26 051 – 25 362 – 25 220 – 27 190 osôb, čo predstavuje 48,21 % – 48,32 % – 46,71 % – 47,38 % – 46,02 % z celkového počtu úmrtí. Spomedzi chorôb obehového systému je ischemická choroba srdca (I20-I25) najpočetnejšou príčinou smrti a percento úmrtí z tejto príčiny pokleslo za sledované obdobie piatich rokov len nepatrne, pričom mierny klesajúci trend bol zaznamenaný aj pred pandemiou, aj po roku 2019. Percento úmrtí pre ischemickú chorobu srdca z celkového počtu úmrtí za roky 2016 až 2020 predstavovalo: 28,33 % – 27,88 % – 26,05 % – 26,97 % – 26,05 % [26].

Zvýšené hladiny lipidových parametrov v sére – celkový cholesterol (TC), cholesterol v lipoproteínoch nízkej hustoty (LDL-C), triacylglyceroly (TAG), celkové lipidy,  $\beta$ -lipoproteíny – predstavujú dobre známe rizikové faktory, ktoré sú spojené so zvýšeným kardiovaskulárnym rizikom [14]. Metabolizmus a vzájomné interakcie jednotlivých lipidov sú však oveľa komplexnejšie než sa predpokladalo a ich funkcie, najmä v prípade lipoproteínov s vysokou hustotou (HDL častíc), nie sú žiaľ doposiaľ úplne prebádané. Najznámejšou funkciou HDL častíc je znižovanie lipidovej záťaže periférnych tkanív vychytávaním a reverzným transportom cholesterolu do pečene. Funkcie HDL častíc sú však omnoho rôznorodejšie, než

len odstraňovanie cholesterolu z makrofágov a penových buniek prítomných v aterosklerotických plátoch artérií. Zúčastňujú sa aj zápalových procesov, zrážania, regulácie a aktivácie komplementu a inhibície proteolýzy [7, 15, 16, 29]. Rôznorodé amfifilné aj neutrálne lipidy obsiahnuté v HDL časticiach interagujú navzájom, ale aj s inými triedami lipoproteínov, s plazmatickými proteínmi a okolitými bunkami. Proteíny tvoria približne 50 % hmotnosti HDL lipoproteínov. Hlavnými apoproteínmi sú apoA1 (tvoriaci 70 % proteínovej hmoty) a apoA2 (tvoriaci 20 % proteínovej hmoty). Okrem nich obsahujú HDL častice ďalších vyše 80 rôznych proteínov [23] a transportujú aj regulačné mikroRNA. Samotná HDL molekula je heterogénnou populáciou nanočastíc. Počas svojej existencie, interakciou s ostatnými zložkami plazmy, makrofágmi, cirkuláciou až po spätné vychytávanie zložiek hepatocytmi resp. obličkami vzniká viacero poddruhov HDL častíc, takzvané subfrakcie, ktoré sa líšia zložením, veľkosťou, biochemickými vlastnosťami a funkciami. Funkčná heterogenita HDL častíc je dôsledkom štruktúrálnej biochemickej heterogenity molekuly. Pri laboratórnom stanovení bežného parametra: cholesterolu v HDL časticiach (HDL-C) sa nekvantifikuje celá lipoproteínová častica, ale len cholesterol, ktorý je v nej obsiahnutý. Stanovenie HDL-C teda nie je stanovením funkčnosti či počtu HDL častíc. Je známe, že redukcia HDL-C zvyšuje výskyt aterosklerózy a srdcovocievnych ochorení [22]. Napriek jasným epidemiologickým dôkazom, že nízke hodnoty HDL-C v sére sú rizikovým faktorom pre ICHS, klinické štúdie zamerané na zvýšenie HDL-C reportujú kontroverzné výsledky pri znižovaní rizika ochorenia srdca a ciev [1, 23]. Stanovenie HDL-C neodzrkadľuje výskyt ateroprotektívnych proteínov v HDL časticiach a zvýšenie koncentrácie HDL-C nemusí

znamenáť vyššiu efektívnosť proteínov, zúčastňujúcich sa na procesoch znižujúcich riziko aterosklerózy.

Najnovšie sa výskum zameriava na stanovenie kapacity efluxu cholesterolu (cholesterol efflux capacity – CEC). CEC predstavuje kapacitu HDL častíc odoberať cholesterol z buniek bohatých na lipidy, napríklad z makrofágov, a predchádzať tak vzniku penových buniek a lipidmi sprostredkovaného subklinického zápalu endotelu. CEC je citlivým ukazovateľom kardiovaskulárneho rizika nezávisle od koncentrácie HDL-C [20]. Iné štúdie uprednostňujú stanovenie funkčných proteínov HDL častíc. Najviac spomínaným je enzým *paraoxonázal* (PON1), v prípade ktorého sa stanovuje buď koncentrácia, alebo jeho enzýmová aktivita. PON1 je významným aterosprotektívnym antioxidantom a zároveň ukazovateľom funkčnosti HDL častíc.

Predložená práca bola zameraná na stanovenie subfrakcií HDL častíc, a kvantifikáciu cholesterolu v nich. Prvotné analýzy HDL častíc uskutočnené ultracentrifugáciou umožnili identifikovanie dvoch poddruhov: veľkých a ľahkých HDL2 (1,063 – 1,125 g/ml; 43 % proteínov a 57 % lipidov) a malých denzných HDL3 (1,125 – 1,21 g/ml; 58 % proteínov a 42 % lipidov) [8, 24]. Kým pokles subpopulácie veľkých HDL2 bol od začiatku spájaný so zvýšením rizika infarktu myokardu a postprandiálnou lipémiou, o HDL3 časticiach a ich vplyve na aterogenicitu sa dlho polemizovalo [24]. Fluktuácie v koncentrácii HDL častíc sa pripisovali najmä zmenám v HDL2. Vývoj analytických metód podporil výskum HDL častíc a postupne sa charakterizovali ďalšie subpopulácie ako aj ich špecifické funkcie. Metódou Lipoprint dokážeme identifikovať až 10 subfrakcií HDL. Stanovením ich hodnôt u pacientov s podozrením na ischemickú chorobu srdca a pozitívnym alebo negatívnym nálezom pri selektívnej koronárnej angiografii (selektívnou koronarografiou, SKG) sme študovali klinickú koreláciu, ktorá by v budúcnosti mohla prispieť k selekcii rizikových pacientov. Zároveň, presnejšia identifikácia subfrakcií zúčastňujúcich sa aterogenézy by mohla prispieť k cielenejšej terapii ochorenia obehového systému.

## Materiál a metodika

Probandmi štúdie sú pacienti vo veku nad 18 rokov prijatí s podozrením na ischemickú chorobu srdca na 1. kardiologickú kliniku UPJŠ LF a VÚSCH, a.s.. Pacienti podstúpili odber krvi na zistenie vybraných laboratórnych ukazovateľov (celkový cholesterol, TAG, HDL-C, LDL-C, kreatinín, močovina, fibrinogén, C-reaktívny proteín, *aspartátaminotransferáza*, *alanínaminotransferáza*, sodík, draslík) a boli vyšetrení SKG. Na základe nálezu pri SKG boli pacienti zaradení do skupín nasledovne: skupina pacientov bez nálezu – skupina 0 a skupina pacientov s pozitívnym nálezom, pričom tento nález bol odstupňovaný podľa závažnosti do podskupín 1 až 5. Kritériom na nezaradenie do štúdie bola v minulosti potvrdená prítomnosť ischemickej choroby srdca a záznam v osobnej anamnéze o akútnom koronárnom syndróme. Elektroforetická separácia lipoproteínov nízkej hustoty bola vykonaná metódou Lipoprint® Lipoprotein Subfractions Testing System (Quantimetrix, US) [2, 10, 11]. Výsledkom je kvantifikácia cholesterolu v subfrakciách lipoproteínov

s vysokou hustotou (10 frakcií, HDL 1 až 10). Štatistická analýza bola spracovaná použitím programu SPSS Statistics 22 (IBM). Výskum bol schválený 24.1.2019 Etickou komisiou UPJŠ LF a Etickou komisiou VÚSCH, a.s..

## Výsledky

Priemerný vek, BMI, hodnoty systolického krvného tlaku a vybrané laboratórne ukazovatele pacientov (celkový cholesterol, TAG, HDL-C, LDL-C, fibrinogén) zaradených do štúdie u ktorých bola zároveň do mája 2022 vykonaná elektroforetická separácia HDL častíc sú uvedené v tabuľke č. 1. Z uvedených dát je zrejmé, že vo všetkých skupinách prevažovali pacienti s nadváhou až obezitou. Fyziologickú hodnotu BMI vykazovalo len 8 mužov (11,42 %) (3 zaradení do skupiny 0, ostatní po jednom do podskupín 1, 2, 3 a dvaja do podskupiny 5) a iba 6 žien (17,14 %) (4 zaradené do skupiny 0 a po jednej do podskupín 3 a 4). Najvyššie priemerné hodnoty systolického krvného tlaku boli zaznamenané u pacientov bez pozitívneho nálezu SKG (skupina 0), avšak priemerný systolický krvný tlak bol nad 135 mm Hg aj v podskupinách s pozitívnym nálezom SKG. Napriek tomu bol štatisticky významný rozdiel detegovaný v týchto hodnotách medzi pacientmi bez nálezu a s nálezom SKG (Tab. 2). Štatisticky významný rozdiel v lipidových parametroch a fibrinogéne medzi pacientami s a bez nálezu SKG nebol potvrdený (Tab. 2). Hodnoty priemerného LDL-C boli v oboch skupinách porovnateľné ( $2,94 \pm 0,95$  mmol/l u pacientov bez nálezu a  $2,99 \pm 1,13$  mmol/l u pacientov s pozitívnym nálezom SKG,  $p = 0,851$ , Tab. 2) a výsledky hodnôt LDL-C korelovali s nálezom len veľmi slabo ( $+6,7 \%$ ,  $p = 0,501$ , Tab. 4).

Priemerná hodnota HDL-C bola vo všetkých skupinách fyziologická. Výsledky vyhodnotenia kvantifikácie cholesterolu v subfrakciách HDL sú sumarizované v tabuľke 3. Subfrakcie uvádzame ako veľké (HDL 1 až 3), stredné (HDL 4 až 7) a malé (HDL 8 až 10). Priemerné hodnoty cholesterolu v jednotlivých subfrakciách, ani kumulatívna koncentrácia vo veľkých, stredných a malých HDL časticiach nepreukázali štatisticky významné rozdiely medzi pacientami s podozrením na ICHS bez nálezu a s pozitívnym nálezom SKG.

Štatisticky významne silná korelácia sa medzi nálezom a koncentráciou cholesterolu v HDL subfrakciách potvrdila jedine v prípade parametra HDL 2 ( $p = 0,025^*$ , Tab. 4). Vyhodnotená bola aj korelácia ďalšieho významného rizikového faktora – pomeru TAG/HDL-C, ako aj pomeru TAG ku cholesterolu v jednotlivých subfrakciách HDL. Pozitívna korelácia pomeru so závažnosťou nálezu bola očakávaná, štatisticky významná korelácia však bola potvrdená jedine pri zohľadnení malých denzných HDL (HDL 8 až 10,  $p = 0,042^*$ , Tab. 4).

Zo 70 mužov malo 17 (24 %) negatívny nález na SKG a 15 (21 %) malo významný pozitívny nález (skupina 5); z 35 žien malo 14 (40 %) negatívny nález na SKG a 4 (11 %) malo významný pozitívny nález (skupina 5, Tab. 5). Vzhľadom na to boli sledované korelačné faktory medzi nálezom a cholesterolom v subfrakciách HDL u oboch pohlaví zvlášť. U mužov, u ktorých sa potvrdil vyšší výskyt pozitívneho nálezu na SKG, tento nález ne-

signifikantne koreloval nepriamo s najväčšími HDL 1 (-4,1 %) a HDL 2 (-16,5 %), denznejšími strednými HDL 6 (-10,5 %) a HDL 7 (-13,2 %) a so všetkými malými HDL 8 (-10,6 %) HDL 9 (-3,6 %) a HDL 10 (-4,1 %). Pozitívne korelácie medzi nálezom a frakciami HDL 3, 4 a 5 boli veľmi slabé +3,7 % – +3,6 % – +3,6 % a neboli štatisticky významné. U žien bola inverzná korelácia medzi nálezom a cholesterolom vo veľkých HDL frakciách výraznejšia (HDL 1: -18,0 %, HDL 2: -18,1 %,

HDL 3: -20,8 %). Na rozdiel od mužov, spomedzi stredných HDL u žien negatívne korelovali s nálezom väčšie zo stredných frakcií HDL 4 (-9,4 %) a HDL 5 (-9,9 %) a pozitívne denznejšie frakcie HDL 6 (+5,2 %) a HDL 7 (+3,9 %). Všetky malé frakcie korelovali s nálezom u žien pozitívne: HDL 8: +8,0 %, HDL 9: +11,8 %, HDL 10: +9,0 % (Tab. 6). Podobne ako u mužov, ani tieto korelácie neboli významné.

**Table 1 Mean age, BMI, systolic blood pressure values and basic laboratory parameters in patients with suspected coronary artery disease based on the findings of coronary angiography**

findings on coronary angiography	Age [years]	BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	SBP [mmHg]	TC [mmol/l]	TAG [mmol/l]	HDL-C [mmol/l]	LDL-C [mmol/l]	FBG [g/l]
0, N = 31	61.55±10.67	31.16±7.97	147±16	4.68±1.21	1.54±0.85	1.30±0.33	2.94±0.95	3.23±0.91
1, N = 6	62.67 ± 10.50	31.08±4.69	137±10	4.00±1.23	1.10±0.40	1.28±0.17	2.37±1.03	3.24±0.79
2, N = 8	69.13±9.83	30.63±4.05	144±11	5.39±0.98	1.84±1.51	1.30±0.26	3.36±0.79	3.10±0.55
3, N = 21	67.38±7.73	32.02±4.77	139±16	4.66±1.62	1.82±0.78	1.24±0.36	2.91±1.36	3.35±0.62
4, N = 20	65.75±9.59	31.47±5.78	139±21	4.53±1.32	1.73±0.77	1.18±0.27	2.84±1.22	3.26±0.90
5, N = 19	61.26±8.79	30.60±4.24	138±17	4.99±0.97	1.73±0.71	1.16±0.19	3.24±0.84	3.46±0.65

0 – without positive finding on coronary angiography, 1-5 – with mild to severe findings on coronary angiography, BMI – body mass index, SBP – systolic blood pressure, TC – total cholesterol; TAG – triacylglycerols, HDL-C – high-density lipoprotein-cholesterol, LDL – low-density lipoprotein-cholesterol, FBG – fibrinogen

**Table 2 Results of t-test (equality of means) of age, BMI, systolic blood pressure and basic laboratory parameters in patients with suspected coronary artery disease based on the findings on coronary angiography**

findings on coronary angiography	Age [years]	BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	SBP [mmHg]	TC [mmol/l]	TAG [mmol/l]	HDL-C [mmol/l]	LDL-C [mmol/l]	FBG [g/l]
0, N = 31	61.55±10.67	31.16±7.97	147±16	4.68±1.21	1.54±0.85	1.30±0.33	2.94±0.95	3.23±0.91
1-5, N = 74	65.18±9.16	31.07±4.53	139±16	4.73±1.31	1.71±0.84	1.21±0.27	2.99±1.13	3.32±0.71
Levene's Test for Equality of Variance, <i>p</i>	0.214 <sup>a</sup>	0.004 <sup>b</sup>	0.844 <sup>a</sup>	0.716 <sup>a</sup>	0.815 <sup>a</sup>	0.304 <sup>a</sup>	0.409 <sup>a</sup>	0.310 <sup>a</sup>
t-test for Equality of Means, <i>p</i>	0.081 <sup>ns</sup>	0.953 <sup>ns</sup>	0.024 <sup>*</sup>	0.843 <sup>ns</sup>	0.343 <sup>ns</sup>	0.156 <sup>ns</sup>	0.851 <sup>ns</sup>	0.598 <sup>ns</sup>

0 – without positive finding on coronary angiography, 1-5 – with mild to severe findings on coronary angiography, BMI – body mass index, SBP – systolic blood pressure, TC – total cholesterol; TAG – triacylglycerols, HDL-C – high-density lipoprotein-cholesterol, LDL – low-density lipoprotein-cholesterol, FBG – fibrinogen, <sup>a</sup> – Equal variances assumed, <sup>b</sup> – Equal variances not assumed, <sup>ns</sup> – not significant, <sup>\*</sup> – difference is significant at the 0.05 level

**Table 3 Results of t-test (equality of means) of HDL subfractions in patients with suspected coronary artery disease based on the findings of coronary angiography**

Findings on coronary angiography	Large HDL [mmol/l]	Intermediate HDL [mmol/l]	Small HDL [mmol/l]
0, N = 31	0.34 ± 0.22	0.66 ± 0.15	0.30 ± 0.11
1-5, N = 74	0.27 ± 0.16	0.65 ± 0.17	0.29 ± 0.12
Levene's Test for Equality of Variance, <i>p</i>	0.620 <sup>a</sup>	0.741 <sup>a</sup>	0.787 <sup>a</sup>
t-test for Equality of Means, <i>p</i>	0.091 <sup>ns</sup>	0.622 <sup>ns</sup>	0.719 <sup>ns</sup>

0 – without positive finding on coronary angiography, 1-5 – with mild to severe findings on coronary angiography, HDL – high-density lipoprotein, <sup>a</sup> – Equal variances assumed, <sup>ns</sup> – not significant

Table 4 Correlation analysis in patients with suspected coronary artery disease

Correlation with coronary angiography	N = 105	
	Pearson Correlation <i>r</i>	Significance <i>p</i>
Age [years]	+0.072	0.462 <sup>ns</sup>
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	-0.025	0.797 <sup>ns</sup>
SBP [mmHg]	-0.204	0.037*
TC [mmol/l]	+0.053	0.594 <sup>ns</sup>
TAG [mmol/l]	+0.122	0.215 <sup>ns</sup>
HDL-C [mmol/l]	-0.190	0.052 <sup>ns</sup>
LDL-C [mmol/l]	+0.067	0.501 <sup>ns</sup>
FBG [g/l]	+0.089	0.368 <sup>ns</sup>
Large HDL [mmol/l]	-0.183	0.062 <sup>ns</sup>
HDL 1	-0.139	0.158 <sup>ns</sup>
HDL 2	-0.218	0.025*
HDL 3	-0.124	0.207 <sup>ns</sup>
Intermediate HDL [mmol/l]	-0.130	0.185 <sup>ns</sup>
HDL 4	-0.096	0.332 <sup>ns</sup>
HDL 5	-0.092	0.349 <sup>ns</sup>
HDL 6	-0.112	0.256 <sup>ns</sup>
HDL 7	-0.117	0.234 <sup>ns</sup>
Small HDL [mmol/l]	-0.025	0.803 <sup>ns</sup>
HDL 8	-0.085	0.389 <sup>ns</sup>
HDL 9	-0.026	0.791 <sup>ns</sup>
HDL 10	+0.013	0.897 <sup>ns</sup>
TAG / HDL-C	+0.157	0.109 <sup>ns</sup>
TAG / Large HDL	+0.157	0.110 <sup>ns</sup>
TAG / Intermediate HDL	+0.139	0.157 <sup>ns</sup>
TAG / Small HDL	+0.199	0.042*

BMI – body mass index, SBP – systolic blood pressure, TC – total cholesterol; TAG – triacylglycerols, HDL-C – high-density lipoprotein-cholesterol, LDL – low-density lipoprotein-cholesterol, FBG – fibrinogen, HDL – high-density lipoprotein, TAG – triacylglycerols, ns – not significant, \* – correlation is significant at the 0.05 level

Table 6 Correlation analysis of HDL subfractions in male and female patients with suspected coronary artery disease

Correlation, coronary angiography	Men, N = 70		Women, N = 35	
	Pearson Correlation <i>r</i>	Significance <i>p</i>	Pearson Correlation <i>r</i>	Significance <i>P</i>
Large HDL [mmol/l]	<b>-0.061</b>	0.618 <sup>ns</sup>	<b>-0.213</b>	0.219 <sup>ns</sup>
HDL 1	-0.041	0.738 <sup>ns</sup>	-0.180	0.301 <sup>ns</sup>
HDL 2	-0.165	0.173 <sup>ns</sup>	-0.181	0.300 <sup>ns</sup>
HDL 3	+0.037	0.763 <sup>ns</sup>	-0.208	0.231 <sup>ns</sup>
Intermediate HDL [mmol/l]	<b>-0.048</b>	0.693 <sup>ns</sup>	<b>-0.046</b>	0.794 <sup>ns</sup>
HDL 4	+0.036	0.766 <sup>ns</sup>	-0.094	0.591 <sup>ns</sup>
HDL 5	+0.036	0.768 <sup>ns</sup>	-0.099	0.573 <sup>ns</sup>
HDL 6	-0.105	0.385 <sup>ns</sup>	+0.052	0.765 <sup>ns</sup>
HDL 7	-0.132	0.276 <sup>ns</sup>	+0.039	0.825 <sup>ns</sup>
Small HDL [mmol/l]	<b>-0.062</b>	0.612 <sup>ns</sup>	<b>+0.101</b>	0.562 <sup>ns</sup>
HDL 8	-0.106	0.381 <sup>ns</sup>	+0.080	0.649 <sup>ns</sup>
HDL 9	-0.036	0.765 <sup>ns</sup>	+0.118	0.500 <sup>ns</sup>
HDL 10	-0.041	0.736 <sup>ns</sup>	+0.090	0.608 <sup>ns</sup>

HDL – high-density lipoprotein, ns – not significant

**Table 5** Frequency table in male and female patients with suspected coronary artery disease based on the findings of coronary angiography

Coronary angiography findings	0	1	2	3	4	5
Men, N = 70	17 (24.29%)	4 (5.71%)	5 (7.14%)	11 (15.71%)	18 (25.71%)	15 (21.43%)
Women, N=35	14 (40.00%)	2 (5.71%)	3 (8.57%)	10 (28.57%)	2 (5.71%)	4 (11.43%)

0 – without positive finding on coronary angiography, 1-5 – with mild to severe findings on coronary angiography

Výsledky porovnania základných laboratórných ukazovateľov a cholesterolu v subfrakciách HDL u mužov a žien sumarizujú tabuľky 7 a 8. Štatisticky významný rozdiel medzi mužmi a ženami bol v hodnote HDL-C ( $p < 0,001^{***}$ ) a v SKG náleze ( $p = 0,024^*$ ). Rozdiel v hodnotách celkového cholesterolu bol na hranici signifikantnosti ( $p = 0,052$ ). Ženy mali okrem HDL 10 vyššie priemerné hodnoty vo všetkých HDL subfrakciách. Signi-

fikantne rozdielne boli hodnoty medzi mužmi a ženami v cholesterole vo veľkých (HDL 1 - 3) a stredných (HDL 4-7) frakciách (Tab. 8). Najvýznamnejší rozdiel bol v cholesterole na prechode veľkých a stredných frakcií HDL 3 a HDL 4 (obe  $p < 0,001^{***}$ ). Z malých HDL frakcií (HDL 8 - 10) bol hraničný rozdiel v cholesterole v subfrakcii HDL 8 ( $p = 0,058$ ).

**Table 7** Results of t-test (equality of means) in male and female patients with suspected coronary artery disease

Gender	Findings on coronary angiography	Age [years]	BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	SBP [mmHg]	TC [mmol/l]	TAG [mmol/l]	HDL-C [mmol/l]	LDL-C [mmol/l]	FBG [g/l]
Men N = 70	2.77±1.90	63.59±9.86	30.87±4.70	141±17	4.55±1.28	1.71±0.95	1.14±0.22	2.88±1.10	3.27±0.84
Women N = 35	1.89±1.81	65.14±9.49	31.55±7.41	141±16	5.06±1.21	1.57±0.58	1.43±0.34	3.17±1.01	3.33±0.62
Levene's Test for Equality of Variance, <i>p</i>	0.784	0.921 <sup>a</sup>	0.020 <sup>b</sup>	0.448 <sup>a</sup>	0.577 <sup>a</sup>	0.043 <sup>b</sup>	0.002 <sup>b</sup>	0.531 <sup>a</sup>	0.290 <sup>a</sup>
t-test for Equality of Means, <i>p</i>	0.024 <sup>*</sup>	0.442 <sup>ns</sup>	0.623 <sup>ns</sup>	0.885 <sup>ns</sup>	0.052 <sup>ns</sup>	0.357 <sup>ns</sup>	4.51E-05 <sup>***</sup>	0.190 <sup>ns</sup>	0.681 <sup>ns</sup>

BMI – body mass index, SBP – systolic blood pressure, TC – total cholesterol; TAG – triacylglycerols, HDL-C – high-density lipoprotein-cholesterol, LDL – low-density lipoprotein-cholesterol, FBG – fibrinogen, *a* – Equal variances assumed, *b* – Equal variances not assumed, *ns* – not significant, \* – difference is significant at the 0.05 level, \*\*\* – difference is significant at the 0.001 level

**Table 8** Results of t-test (equality of means) of HDL subfractions in male and female patients with suspected coronary artery disease

Gender	HDL 1 [mmol/l]	HDL 2 [mmol/l]	HDL 3 [mmol/l]	HDL 4 [mmol/l]	HDL 5 [mmol/l]	HDL 6 [mmol/l]	HDL 7 [mmol/l]	HDL 8 [mmol/l]	HDL 9 [mmol/l]	HDL 10 [mmol/l]
Men N = 70	0,03±0,03	0,09±0,06	0,13±0,08	0,11±0,06	0,11±0,03	0,28±0,06	0,11±0,03	0,10±0,03	0,08±0,03	0,11±0,06
Women N=35	0,04±0,05	0,14±0,09	0,19±0,09	0,17±0,08	0,14±0,05	0,32±0,07	0,12±0,03	0,11±0,03	0,09±0,03	0,10±0,06
Levene's Test for Equality of Variance, <i>p</i>	0.237 <sup>a</sup>	0.180 <sup>a</sup>	0.342 <sup>a</sup>	0.043 <sup>b</sup>	0.020 <sup>b</sup>	0.257 <sup>a</sup>	0.564 <sup>a</sup>	0.713 <sup>a</sup>	0.885 <sup>a</sup>	0.819 <sup>a</sup>
t-test for Equality of Means, <i>p</i>	0.038 <sup>*</sup>	0.004 <sup>**</sup>	2.82E-04 <sup>***</sup>	5.41E-04 <sup>***</sup>	0.002 <sup>**</sup>	0.002 <sup>**</sup>	0.049 <sup>*</sup>	0.058 <sup>ns</sup>	0.072 <sup>ns</sup>	0.557 <sup>ns</sup>

HDL – high-density lipoprotein, *a* – Equal variances assumed, *b* – Equal variances not assumed, *ns* – not significant, \* – difference is significant at the 0.05 level, \*\* – difference is significant at the 0.01 level, \*\*\* – difference is significant at the 0.05 level

## Diskusia

Probandmi štúdie boli pacienti s podozrením na ischemickú chorobu srdca, väčšina s nadváhou až obezitou, hypertenziou a hyperlipidémiou, bez výrazných rozdielov medzi základnými laboratórnymi ukazovateľmi a cholesterolom v subfrakciách HDL. Selektívna koronárna angiografia je nástrojom pre potvrdenie prítomnosti stenóz a je prínosom aj pri odhalení už aj subklinickej formy aterosklerózy [18]. Prasad a kol. skúmali príčiny zvýšenej kardiovaskulárnej úmrtnosti u žien a poukázali na význam stanovenia TAG ako aj pomeru TAG/HDL-C

ako významného rizikového faktora aterogenicity [19]. Pomer TAG/HDL-C sa uvádza aj v iných štúdiách ako marker kardiovaskulárneho rizika u pacientov s chronickou obličkovou nedostatočnosťou, infarktom myokardu, a ochorením srdca a ciev [5, 12, 19, 21, 25, 27]. V predloženej štúdií bol vyhodnotený tak pomer TAG/HDL-C, ako aj pomery TAG/(HDL 1 - 3), TAG/(HDL 4 - 7) a TAG/(HDL 8 - 10). Parameter TAG ku malým denzným HDL (HDL 8 - 10) umožnil lepšie potvrdenie kardiovaskulárneho rizika, keďže signifikantne koreloval s výsledkami SKG.

Xu a kol. [28] vo svojom výskume u pacientov s hyperlipidémiou popísali posun distribúcie HDL častíc smerom k menším denznejším časticiam, ktorý vysvetľujú abnormálnym procesom maturácie HDL počas ICHS. Oproti zdravým jedincom zaznamenali signifikantné zvýšenie najmenších pre $\beta$ 1HDL, malých HDL3c, HDL3b a HDL3a ale aj najväčších pre $\beta$ 2HDL častíc. U pacientov sa signifikantne znížili veľké HDL2a a HDL2b. V sledovanom súbore neboli zaznamenané signifikantné zmeny, avšak u mužov, u ktorých boli pozitívne nálezy pri SKG častejšie, cholesterol v najmenších a najväčších HDL časticiach klesali so závažnosťou nálezov.

Posun k menším HDL časticiam pri aterogénnej dyslipidémii u detí bol potvrdený aj v práci Numata [17], ktorý vyzdvihuje významnú antioxidačnú aktivitu malých denzných HDL častíc, avšak poukazuje aj na to, že tá je v podmienkach aterogénnej dyslipidémie ohrozená. Autori The Genes Study [6] dokázali okrem zníženej koncentrácie HDL častíc aj nižšiu koncentráciu malých denzných HDL a žiadne zmeny v HDL-C a veľkých HDL u zosnulých pacientov v porovnaní s prežívajúcimi pacientami s ICHS. Aj iné štúdie vyzdvihujú aterosprotektívny vplyv malých denzných HDL práve v podmienkach aterogénnej dyslipidémie [4, 13]. Camont a kol. [3] dokonca pripisujú všetky základné funkcie HDL častíc – kapacita efluxu cholesterolu, antioxidačná ochrana LDL, antitrombotická, protizápalová, antiapoptotická aktivita – práve malým denzným frakciám. Tvorba malých denzných HDL častíc – či už ako dôsledok, alebo ako ochranný mechanizmus organizmu na aterogenicitu – môže súvisieť okrem iného práve s neúmerným obohatením HDL o triacylglyceroly [13], čo poukazuje na dôležitosť sledovania pomeru TAG/HDL-C, najmä ak nie je príležitosť stanoviť počet alebo veľkosť frakcií lipoproteínov HDL. Dôvodom nízkej koncentrácie HDL-C v sére, ktorá koreluje so zvýšeným aterogénnym rizikom, môže byť zmenený profil HDL lipoproteínov a nie nižšie množstvo HDL častíc. Naopak, zvýšenie množstva HDL častíc – ktorá sa síce môže preukázať aj vo zvýšení HDL-C – v podmienkach aterogénnej dyslipidémie by opätovne viedla k posunu v smere malých denzných lipoproteínov. Navyše, v niekoľkých kohortových štúdiách dospeléj populácie bola preukázaná súvislosť v tvare U medzi HDL-C a mortalitou [1, 9], čo sa vysvetľuje genetickými mutáciami spojenými s veľmi vysokým HDL-C, alebo zhoršenou funkciou HDL pri vysokých koncentráciách HDL-C. Zostáva zodpovedať otázku, či je zmena v HDL lipoproteínovom profile príčina, alebo dôsledok aterogénnej dyslipidémie. Zmenený lipidový – a teda aj lipoproteínový – profil, by však mal slúžiť kardiológom pri rozhodovacom procese nastavenia správnej terapie a pri včasnej detekcii rizikových pacientov.

## Záver

Stanovenie celkového cholesterolu a HDL-cholesterolu je pri rozhodovacom procese kardiológa nepostačujúce. Aterogénna dyslipidémia posúva HDL častice smerom k malým denzným HDL. Bez ohľadu na to, či je táto skutočnosť príčinou alebo dôsledkom aterogenicity, metóda Lipoprint ponúka nástroj pre personalizovaný prístup pri manažmente pacienta.

## Literatúra

- Allard-Ratick, M.P., Sandesara, P.B., Quyyumi, A.A., Sperling, L.S.: Everything in Moderation: Investigating the U-Shaped Link Between HDL Cholesterol and Adverse Outcomes. *US Cardiol Rev.* 13, 2019, (1): 49-53. doi:10.15420/usc.2019.3.2.
- Birková, A. a kol.: Lipoproteínová frakcia IDL u detí a adolescentov s nadváhou a obezitou. *Ateroskleróza.* 23, 2019, (3-4):1345-349.
- Camont, L. et al.: Small, dense high-density lipoprotein-3 particles are enriched in negatively charged phospholipids: Relevance to cellular cholesterol efflux, antioxidative, antithrombotic, anti-inflammatory, and antiapoptotic functionalities. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33, 2013, (12):2715-723. doi:10.1161/ATVBAHA.113.301468.
- Camont, L., Chapman, M.J., Kontush, A.: Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease. *Trends in Molecular Medicine.* 17, 2011, (10):594-603. doi:10.1016/j.molmed.2011.05.013.
- Deng, Q.W. et al.: Triglyceride to high-density lipoprotein cholesterol ratio predicts worse outcomes after acute ischaemic stroke. *Eur J Neurol.* 24, 2017, (2): 283-91. doi:10.1111/ene.13198.
- Duparc, T. et al.: Serum level of HDL particles are independently associated with long-term prognosis in patients with coronary artery disease: The GENES study. *Sci Rep.* 10, 2020, 8138. doi:10.1038/s41598-020-65100-2.
- Gordon, S.M., Remaley, A.T.: High density lipoproteins are modulators of protease activity: Implications in inflammation, complement activation, and atherothrombosis. *Atherosclerosis.* 259, 2017, (Apr), 104-113. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2016.11.015.
- Havel, R.J., Eder, H.A., Bragdon, J.H.: The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest.* 34, 1955, (9):1345-353. doi:10.1172/JCI103182.
- Huang, Y.Q. et al.: The u shaped relationship between high-density lipoprotein cholesterol and all-cause or cause-specific mortality in adult population. *Clin Interv Aging.* 2, 2020, (15):1883-896. doi:10.2147/CIA.S271528
- Hubková, B. a kol.: Dyslipidémia a kardiovaskulárne riziko. *Ateroskleróza.* 23, 2019, (1-2):1265-269.
- Hubková, B., Brenišin, M., Birková, A., Rácz, O.: Zmeny v lipoproteínovom zložení séra v preeklampsii. *Ateroskleróza.* 25, 2021, (3-4):1589-594.
- Chen, H.Y. et al.: Triglyceride to high-density lipoprotein cholesterol ratio predicts cardiovascular outcomes in prevalent dialysis patients. *Med. (United States).* 94, 2015, (10):e619. doi:10.1097/MD.0000000000000619.
- Kontush, A., Chapman, M.J.: Antiatherogenic small, dense HDL - Guardian angel of the arterial wall? *Nat*

- Clin Pract Cardiovas Med. 3, 2006, (3):144-53. doi:10.1038/ncpcardio0500.
14. Langsted, A., Nordestgaard, B.G.: Nonfasting versus fasting lipid profile for cardiovascular risk prediction. *Pathology*. 51, 2019, (2):131-41. doi:10.1016/j.pathol.2018.09.062.
  15. Meri, S., Haapasalo, K.: Function and Dysfunction of Complement Factor H During Formation of Lipid-Rich Deposits. *Front Immunol*. 2020, (11):611830. doi:10.3389/fimmu.2020.611830.
  16. Mineo, C., Deguchi, H., Griffin, J.H., Shaul, P.W.: Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circulation Research*. 11, 2006, (11):1352-364. doi:10.1161/01.RES.0000225982.01988.93.
  17. Numata, M., Arisaka, O.: High density lipoprotein particle size in children: Relation to atherogenic dyslipidemia. *Clin Pediatr Endocrinol*. 13, 2004, (1):1-9. doi:10.1297/cpe.13.1.
  18. Pella, D., Gibarti, C., Pella, Z., Gonsorčík, J.: Vitamín D a koronárne riziko detekované výpočtovou tomografiou. *Athero Rev*. 2019, (4):176-78.
  19. Prasad, M. et al.: Triglyceride and Triglyceride/HDL (High Density Lipoprotein) Ratio Predict Major Adverse Cardiovascular Outcomes in Women With Non-Obstructive Coronary Artery Disease. *J. Am. Heart Assoc*. 8, 2019, (9):e009442. doi:10.1161/JAHA.118.009442.
  20. Ritsch, A. et al.: Cholesterol efflux capacity and cardiovascular disease: The ludwigshafen risk and cardiovascular health (luric) study. *Biomedicines*. 8, 2020, (11):524. doi:10.3390/biomedicines8110524.
  21. Salazar, M.R. et al.: Use of the triglyceride/high-density lipoprotein cholesterol ratio to identify cardiometabolic risk: Impact of obesity? *J Investig Med*. 65, 2017, (2):323-27. doi:10.1136/jim-2016-000248.
  22. Salonen, J.T., Salonen, R., Seppänen, K. et al.: HDL, HDL2, and HDL3 subfractions, and the risk of acute myocardial infarction: A prospective population study in eastern finnish men. *Circulation*. 84, 1991, (1): 129-39 doi:10.1161/01.CIR.84.1.129.
  23. Shao, B., Heinecke, J. W.: Quantifying HDL proteins by mass spectrometry: how many proteins are there and what are their functions? *Expert Review of Proteomics*. 15, 2018, (1):31-40. doi:10.1080/14789450.2018.1402680.
  24. Schaefer, E.J. et al.: The composition and metabolism of high density lipoprotein subfractions. *Lipids*. 14, 1979, (5):511-22. doi:10.1007/BF02533471.
  25. Sonmez, A. et al.: The role of plasma triglyceride/high-density lipoprotein cholesterol ratio to predict cardiovascular outcomes in chronic kidney disease. *Lipids Health Dis*. 2015, (14):29. doi:10.1186/s12944-015-0031-4.
  26. Štatistický úrad SR: Obyvateľstvo a migrácia. Dostupné na: <https://slovak.statistics.sk> (Accessed: 19 May 2022).
  27. Wu, H. et al.: Higher serum triglyceride to high-density lipoprotein cholesterol ratio was associated with increased cardiovascular mortality in female patients on peritoneal dialysis. *Nutr. Metab Cardiovasc Dis*. 25, 2015, (8):749-55. doi:10.1016/j.numecd.2015.05.006.
  28. Xu, Y. et al.: Subclasses of Serum HDL in Hyperlipidemia. *J. Sichuan Univ. Medical Sci. Ed*. 2003, 34(2): 238-41.
  29. Zhou, L., Li, C., Gao, L., Wang, A.: High-density lipoprotein synthesis and metabolism (Review). *Molecular Medicine Reports*. 12, 2015, (3):4015-4021. doi:10.3892/mmr.2015.3930.

#### **DETERMINATION OF HDL-CHOLESTEROL SUBFRACTIONS IN ISCHEMIC HEART DISEASE**

Hubková B., Birková A., Mašlanková J., Hertelyová Z., Tóth Š., Pella D.

**Aim** The objective of the present work is to analyze changes in subfractions of high-density lipoproteins in patients with suspected ischemic heart disease, which expands the possibilities of cardiovascular risk assessment.

**Materials and Methods** HDL particle fractionation and cholesterol quantification in the respective subfractions were performed by the Lipoprint® electrophoretic method. The results were correlated with the finding of selective coronary angiography.

**Results** The average values of large HDL 2 in patients without a positive coronary angiography finding were statistically significantly higher than in patients with positive findings ( $0.133 \pm 0.095$  mmol/l and  $0.099 \pm 0.068$  mmol/l, respectively,  $p = 0.041^*$ ). In the other subfractions, there was no statistically significant difference between patients with and without selective coronary angiography findings.

**Conclusion** The determination of HDL-cholesterol is insufficient in the cardiologist's decision-making process. Atherogenic dyslipidemia shifts HDL particles toward small dense HDLs. Whether this is the cause or consequence of atherogenicity, the Lipoprint® method offers a tool for a personalized approach to the management of the patients.

**Key words** HDL, cholesterol, heterogeneity, subfraction, ischemic heart disease

Práca vznikla pri riešení projektov APVV č.17-0550 a OPENMED ITMS: 313011V455.

Autori deklarujú, že nemajú potenciálny konflikt záujmov.

Korešpondenčná adresa autora:

MUDr. Anna Birková, PhD.

Ústav lekárskej a klinickej biochémie UPJŠ LF

Trieda SNP 1, Košice

E-mail: [anna.birkova@upjs.sk](mailto:anna.birkova@upjs.sk)