

## Κλινική Έρευνα

## Ανάλυση της Σύστασης των Λιποπρωτεϊνών του Πλάσματος Ασθενών με Εγκατεστημένη Στεφανιαία Νόσο με Φασματοσκοπία <sup>1</sup>H-NMR

ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ ΠΑΠΑΘΑΝΑΣΙΟΥ<sup>1</sup>, ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΚΩΣΤΑΡΑ<sup>2</sup>, ΜΑΝΗ-TONG CUNG<sup>3</sup>, ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΣΕΦΕΡΙΑΔΗΣ<sup>2</sup>, ΜΩΥΣΗΣ ΕΛΙΣΑΦ<sup>1</sup>, ΕΛΕΝΗ ΜΠΑΪΡΑΚΤΑΡΗ<sup>2</sup>, ΙΩΑΝΝΗΣ ΓΟΥΔΕΒΕΝΟΣ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Παθολογική και Καρδιολογική Κλινική, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων, <sup>2</sup>Εργαστήριο Κλινικής Χημείας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, <sup>3</sup>Laboratoire de Chimie-Physique Macromoleculaire, Nancy Cedex, France

Λέξεις ευρετηρίου:  
Στεφανιαία νόσος,  
λιποπρωτεΐνες,  
σύσταση, <sup>1</sup>H-NMR.

Ημερ. παραλαβής  
εργασίας:  
22 Ιουλίου 2006·  
Ημερ. αποδοχής:  
11 Δεκεμβρίου 2007

Διεύθυνση  
Επικοινωνίας:  
Αθανάσιος  
Παπαθανασίου

Δημητρίου Χατζή 13  
454 45 Ιωάννινα  
e-mail:  
[thanasis.papathanasiou@gmail.com](mailto:thanasis.papathanasiou@gmail.com)

**Εισαγωγή:** Μεταβολές της λιπιδιακής σύστασης και της συνολικής δομής των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων του πλάσματος έχουν συσχετισθεί με παθολογικές καταστάσεις όπως η δυσλιπιδαιμία, η καρδιαγγειακή νόσος, η υπέρταση και η νεφρική νόσος. Στην παρούσα μελέτη, αναλύθηκε με φασματοσκοπία <sup>1</sup>H-NMR η λιπιδιακή σύσταση των HDL και nonHDL λιποπρωτεϊνών ασθενών με στεφανιαία νόσο 3 αγγείων και ασθενών με φυσιολογικά αγγεία.

**Μέθοδοι:** Συλλέξαμε δείγματα ορού 50 ασθενών με εγκατεστημένη στεφανιαία νόσο 3 αγγείων και 41 ασθενών με φυσιολογικά αγγεία τεκμηριωμένα αγγειογραφικά. Κάναμε καταγραφή των κλασικών παραγόντων κινδύνου για την καρδιαγγειακή νόσο και προσδιορισμό του καθιερωμένου λιπιδαιμικού προφίλ των ασθενών. Πραγματοποιήσαμε το διαχωρισμό των HDL από τα nonHDL λιποπρωτεϊνικά σωματίδια με καταβύθιση με θειική δεξτράνη/MgCl<sub>2</sub>. Εκχylίσαμε τα λιπίδια των HDL και nonHDL κλασμάτων με χλωροφόρμιο: μεθανόλη (1:2, v/v). Πραγματοποιήσαμε την καταγραφή των <sup>1</sup>H-NMR φασμάτων σε φασματογράφο Bruker DRX-600.

**Αποτελέσματα:** Στο HDL κλάσμα των ασθενών με νόσο τριών αγγείων, η ποσότητα των τριγλυκεριδίων ήταν σημαντικά υψηλότερη σε σύγκριση με τα άτομα με φυσιολογικά αγγεία ενώ η ποσότητα των εστέρων χοληστερόλης, φωσφατιδυλοχολίνης και σφιγγομυελίνης καθώς και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων όπως το λινολεϊκό, αραχιδονικό και εικοσαπεντενοϊκό ήταν σημαντικά χαμηλότερη. Στο nonHDL κλάσμα παρατηρήθηκε μία σημαντικά υψηλότερη ποσότητα τριγλυκεριδίων και χαμηλότερη ποσότητα πολυακόρεστων λιπαρών οξέων.

**Συμπεράσματα:** Οι ασθενείς με εγκατεστημένη στεφανιαία νόσο παρουσιάζουν σημαντικές μεταβολές στη σύσταση των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος σε σύγκριση με τους ασθενείς με φυσιολογικά στεφανιαία αγγεία. Η περαιτέρω μελέτη της σύστασης των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος θα μπορούσε να αναδείξει ορισμένα από τα συστατικά τους ως δείκτες ύπαρξης της στεφανιαίας νόσου.

**Μ**εταβολές της λιπιδιακής σύστασης και της συνολικής δομής των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων του πλάσματος έχουν συσχετισθεί με παθολογικές καταστάσεις όπως η δυσλιπιδαιμία, η υπέρταση και η νεφρική νόσος<sup>1-3</sup> καθώς και με την ύπαρξη και το βαθμό σοβαρότητας της καρδιαγγειακής νόσου.<sup>4-7</sup>

Αν και οι καθιερωμένες τεχνικές για την ανάλυση της σύστασης των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων παρέχουν την ταυτόχρονη ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των λιπιδίων, δεν χρησιμοποιούνται ευρέως στην κλινική πράξη διότι είναι χρονοβόρες και απαιτούν προεργασία του δείγματος σε πολλά στάδια. Εναλλακτι-

κά, η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου ( $^1\text{H-NMR}$ ) είναι μια μη επεμβατική αναλυτική τεχνική για τη μελέτη της λιπιδιακής σύστασης και της μοριακής δομής των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος<sup>8</sup> καθώς και τη μέτρηση των λιποπρωτεϊνικών υποκλασμάτων.<sup>9</sup> Η μέθοδος με μικρή προεργασία του δείγματος και χωρίς χημική τροποποίηση, παρέχει μια γρήγορη και συνολική ανάλυση των λιπιδίων, τα συστατικά των οποίων εμφανίζονται με χαρακτηριστικό για τη δομή τους σήμα, η ένταση του οποίου είναι ανάλογη της συγκέντρωσής τους. Σε μια πρόσφατη μελέτη η ανάλυση της συνολικής σύστασης των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος με φασματοσκοπία NMR σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο έδειξε ότι η μέθοδος μπορεί να ανιχνεύσει την παρουσία καθώς και την σοβαρότητα της νόσου με ευαισθησία και ειδικότητα άνω του 90%.<sup>10</sup>

Σκοπός της μελέτης ήταν να εκτιμηθεί η συμβολή της φασματοσκοπίας  $^1\text{H-NMR}$  στη λεπτομερή ανάλυση της λιπιδιακής σύστασης των HDL και nonHDL λιποπρωτεϊνών σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο 3 αγγείων και σε ασθενείς με φυσιολογικά αγγεία.

## Υλικό και Μέθοδος

### Πληθυσμός της μελέτης

Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν 50 διαδοχικοί ασθενείς (42 άνδρες – 84% και 8 γυναίκες – 16%, μέσος όρος ηλικίας  $67,7 \pm 9,9$  έτη) με ήπια δυσλιπιδαιμία (επίπεδα ολικής χοληστερόλης ορού  $<250\text{mg/dl}$ ), ελεύθερο ατομικό αναμνηστικό και επιβεβαιωμένο οξύ στεφανιαίο σύνδρομο (έναρξη συμπτωμάτων εντός 12ώρου από την εισαγωγή τους στο νοσοκομείο) με ανεπίπλεκτο κλινική πορεία και αγγειογραφικά εκτεταμένη στεφανιαία νόσο (τουλάχιστον μία στένωση  $>50\%$  του αυλού σε τουλάχιστον 3 επικάρδιες στεφανιαίες αρτηρίες). Η διάγνωση του οξέος στεφανιαίου συνδρόμου έγινε με βάση την κλινική εικόνα (τυπικό στηθαγικό άλγος διάρκειας μεγαλύτερης των 20 λεπτών) και την ύπαρξη ηλεκτροκαρδιογραφικών αλλαγών με ή χωρίς αυξημένους βιοχημικούς δείκτες μυοκαρδιακής νέκρωσης (τιμές ολικής κινάσης της κρεατινίνης (CK) ή του μυοκαρδιακού της κλάσματος (CK-MB) διπλάσιες των φυσιολογικών ή θετικές τιμές τροπονίνης  $\text{I} > 0,3 \text{ ng/ml}$ ). Ως ομάδα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν 41 διαδοχικοί ασθενείς (25 άνδρες – 61% και 16 γυναίκες – 39%, μέσος όρος ηλικίας  $61,2 \pm 9,6$  έτη) με φυσιολογικά αγγεία οι οποίοι υποβλήθηκαν σε στεφανιογραφία στα πλαίσια διερεύνησης άτυπης κλινικής συμπτω-

ματολογίας. Οι ασθενείς αυτοί είχαν υποβληθεί σε δοκιμασία κόπωσης η οποία ήταν μη διαγνωστική και εμφάνισαν «φυσιολογικά» στεφανιαία αγγεία (λεία στεφανιαία αγγεία με φυσιολογική διάμετρο αυλού στη στεφανιογραφία).

Από τη μελέτη αποκλείστηκαν ασθενείς υπό υπολιπιδαιμική αγωγή ή με ιστορικό σακχαρώδη διαβήτη, ηπατικής νόσου ή νεφρικής νόσου, κακοήθειας, καθώς και ασθενείς με νόσο ρευματικής αιτιολογίας. Επίσης αποκλείστηκαν ασθενείς οι οποίοι υποβλήθηκαν σε διαγνωστική στεφανιογραφία στα πλαίσια πρωτογενούς αντιμετώπισης του οξέος στεφανιαίου επεισοδίου, ασθενείς στους οποίους η στεφανιογραφία ανέδειξε λιγότερο εκτεταμένη στεφανιαία νόσο ( $\leq 2$  αγγείων) και ασθενείς με επίπεδα τριγλυκεριδίων πάνω από  $400\text{mg/dl}$ .

### Συλλογή δειγμάτων αίματος και μέτρηση βιοχημικών παραμέτρων

Στους ασθενείς με το επιβεβαιωμένο οξύ στεφανιαίο επεισόδιο η συλλογή του δείγματος πραγματοποιήθηκε εντός του πρώτου 12ώρου από την έναρξη των συμπτωμάτων και την εισαγωγή τους στο νοσοκομείο και στους ασθενείς με φυσιολογικά αγγεία το πρωί πριν την στεφανιογραφία. Ο πλήρης βιοχημικός έλεγχος και οι λιπιδαιμικοί παράμετροι του ορού (ολική χοληστερόλη, HDL-χοληστερόλη και τριγλυκερίδια) μετρήθηκαν σε αναλυτή Olympus AU600 (Olympus Diagnostica, Hamburg, Germany). Οι απολιποπρωτεΐνες (ApoAI, ApoB, ApoE) και η λιποπρωτεΐνη(a) [Lp(a)] μετρήθηκαν σε νεφελόμετρο BN Prospec (Dade-Behring, Lieberbach, Germany). Η LDL χοληστερόλη υπολογίστηκε από την εξίσωση Friedewald.

### Εκχύλιση λιπιδίων

Ο διαχωρισμός των HDL από τα nonHDL σωματίδια πραγματοποιήθηκε με καταβύθιση με θειική δεξτράνη/ $\text{MgCl}_2$ <sup>11</sup> και τα λιπίδια των δυο κλάσμάτων εκχυλίστηκαν με μίγμα χλωροφορμίου:μεθανόλης σύμφωνα με παραλλαγή της μεθόδου Bligh και Dyer.<sup>12</sup>

### Λήψη φάσματος $^1\text{H-NMR}$

Η λήψη των φασμάτων πραγματοποιήθηκε σε φασματογράφο Bruker Avance DRX-600, με ένταση μαγνητικού πεδίου 14,1 Tesla (600MHz) σε θερμοκρασία 298K. Η ταυτοποίηση των χημικών μετατοπί-

σεων, δ, των κορυφών πραγματοποιήθηκε με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία.<sup>13-15</sup>

#### Ανάλυση <sup>1</sup>H-NMR φάσματος εκχυλίσματος λιπιδίων των HDL λιποπρωτεϊνών

Στην Εικόνα 1 φαίνεται ένα αντιπροσωπευτικό φάσμα εκχυλίσματος λιπιδίων των HDL λιποπρωτεϊνών. Στο φάσμα, αυτό διακρίνονται όλες οι κορυφές που αντιστοιχούν στη χοληστερόλη, ελεύθερη (FC) και εστεροποιημένη (EC), τα φωσφολιπίδια φωσφατιδυλοχολίνη (PC) και σφιγγομυελίνη (SM), το σκελετό της γλυκερόλης των τριγλυκεριδίων και τα λιπαρά οξέα (Πίνακας 1 και Εικόνα 1).

**Χοληστερόλη.** Η χοληστερόλη ταυτοποιείται και ποσοτικοποιείται από το χαρακτηριστικό σήμα της μεθυλομάδας του άνθρακα 18 στα 0,70 ppm, από το οποίο υπολογίζεται ο λόγος EC/FC (Εικόνα 1Α).

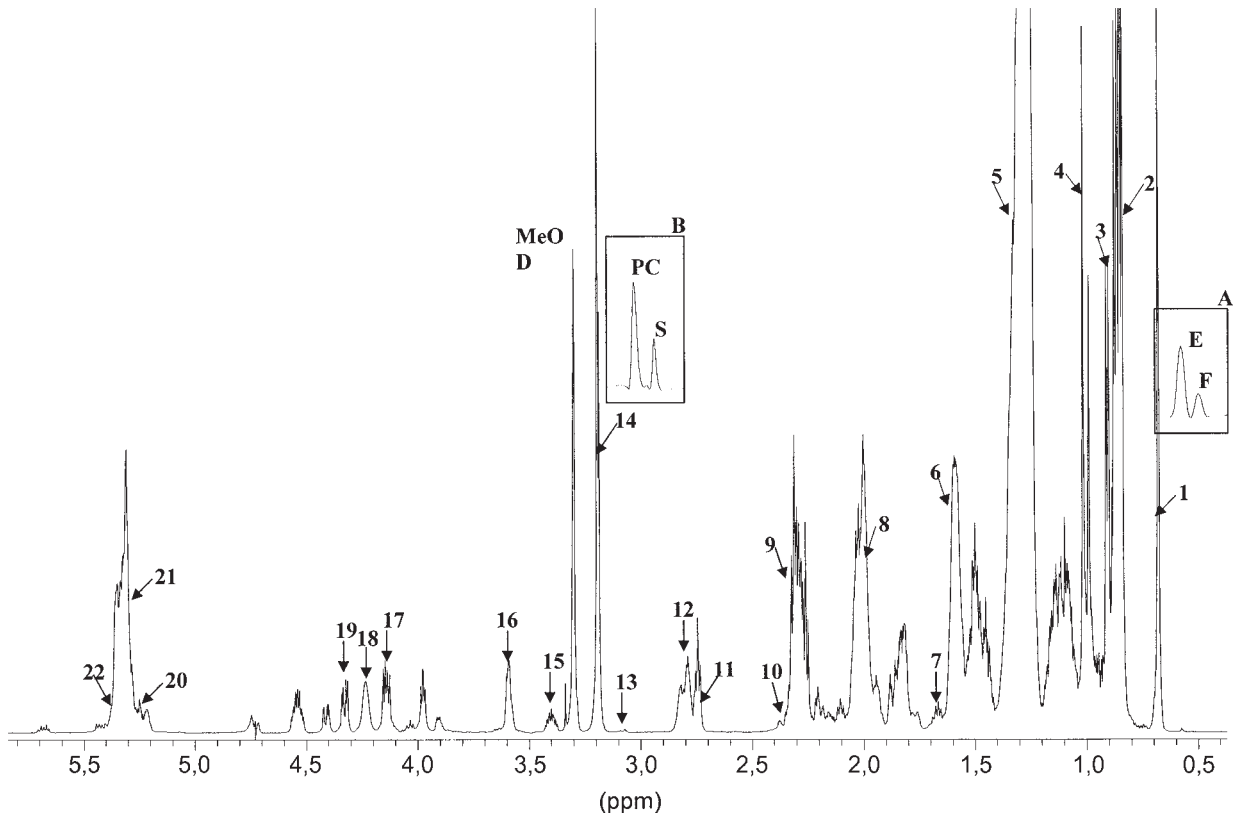
**Φωσφολιπίδια.** Τα δύο κύρια φωσφολιπίδια των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος, η φωσφατιδυλοχολίνη (PC) και η σφιγγομυελίνη (SM) ταυτοποιούνται και ποσοτικοποιούνται από την κορυφή της N-τριμεθυλομάδας (Εικόνα 1) και από την κορυφή αυτή υπολογίζεται ο λόγος τους (Εικόνα 1Β).

**Τριγλυκερίδια.** Ο ποσοτικός προσδιορισμός των τριγλυκεριδίων έγινε από το σήμα στα 4,32 ppm.

**Λιπαρά οξέα.** Τα μεθυλο- και μεθυλενο-πρωτόνια εμφανίζονται συνολικά στις θέσεις 0,88 και 1,30 ppm, αντίστοιχα και τα α- και β- πρωτόνια ως προς την καρβοξυλομάδα συντονίζονται αντίστοιχα στις περιοχές 2,30 και 1,59 ppm. Τα ακόρεστα λιπαρά οξέα ανιχνεύονται από το σήμα των αλληλικών στα 2,04 ppm, των διαλληλικών στα 2,80 ppm και των ολεφινικών πρωτονίων στα 5,36ppm. Από τα επιμέρους ακόρεστα λιπαρά οξέα στο φάσμα NMR μπορούμε να διακρίνουμε το λινελαϊκό οξύ στα 2,75 ppm, το εικοσιδυενοϊκό (DHA) στα 2,38 ppm και το άθροισμα αραχιδονικού και εικοσιπεντενοϊκό (ARA + EPA) στα 1,65 ppm.

#### Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πρόγραμμα Statistica εκδ 6.0 (StatSoft Inc. Tulca, OK, USA). Η σύγκριση των παραμέτρων έγινε με τη δοκιμασία Students' t-test ή Mann-Whitney όπου κρίθηκε απαραίτητο. Η ύπαρξη εκτιμητών για την ύπαρξη στεφανιαίας νόσου μεταξύ των παραμέτρων



Εικόνα 1. <sup>1</sup>H-NMR φάσμα του εκχυλίσματος των ολικών λιπιδίων των HDL λιποπρωτεϊνών.

**Πίνακας 1.** Πίνακας χημικών μετατοπίσεων

Λιπίδιο	Ερμηνεία	Χημική μετατόπιση (ppm)
Χοληστερόλη	1. C <sub>18</sub> H <sub>3</sub>	0,68 ppm
	3. C <sub>26</sub> H <sub>3</sub> , C <sub>27</sub> H <sub>3</sub> , C <sub>21</sub> H <sub>3</sub>	0,87 ppm
	4. C <sub>19</sub> H <sub>3</sub>	1,00 ppm
	15. C <sub>3</sub> H	3,40 ppm
	22. C <sub>6</sub> H	5,36 ppm
Τριγλυκερίδια	17. C <sub>1</sub> H <sup>u</sup> και C <sub>3</sub> H <sup>u</sup> της γλυκερόλης	4,16 ppm
	19. C <sub>1</sub> H <sup>d</sup> και C <sub>3</sub> H <sup>d</sup> της γλυκερόλης	4,32 ppm
	20. C <sub>2</sub> H της γλυκερόλης	5,22 ppm
Φωσφολιπίδια	14. N+(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> της PC & SM	3,20 ppm
	16. CH <sub>2</sub> -N+(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> της PC+SM	3,59 ppm
	18. -O-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -N+(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> της PC+SM	4,24 ppm
	13. CH <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> της PE	3,10 ppm
Λιπαρά οξέα	2. ω-CH <sub>3</sub>	0,88 ppm
	5. (CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub>	1,30 ppm
	6. CO-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>	1,59 ppm
	7. β-CH <sub>2</sub> του ARA+EPA	1,67 ppm
	8. CH-CH=	2,04 ppm
	9. -CO-CH <sub>2</sub>	2,30 ppm
	10. α και β CH <sub>2</sub> του DHA	2,38 ppm
	11. -CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH=CH- του λινελαϊκού	2,75 ppm
	12. (CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH=CH) <sub>n</sub> , n>1	2,80 ppm
	21. CH=CH	5,36 ppm

Συντμήσεις: PC: Φωσφατιδυλοχολίνη, SM: Σφιγγομυελίνη, PE: Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, ARA: Αραχιδονικό οξύ, EPA: Εικοσιπεντενοϊκό οξύ, DHA: Εικοσιδυενοϊκό οξύ

της μελέτης, ο σχετικός κίνδυνος (odds ratio) και τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (95%CI) εκτιμήθηκαν με τη βοήθεια της πολυπαραγοντικής λογιστικής ανάλυση παλινδρόμησης (multivariate logistic regression analysis) Σε κάθε περίπτωση  $p < 0,05$  θεωρήθηκε στατιστικά σημαντικό.

Η συμμετοχή των ασθενών στη μελέτη έγινε ύστερα από ενημέρωσή τους για το σκοπό και τη μεθοδολογία της μελέτης και την ενυπόγραφη συγκατάθεσή τους.

### Αποτελέσματα

Τα κύρια κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των ομάδων ασθενών της μελέτης φαίνονται στον Πίνακα 2. Οι ασθενείς με εκτεταμένη στεφανιαία νόσο σε σύγκριση με τους ασθενείς με φυσιολογικά αγγεία, ήταν περισσότερο ηλικιωμένοι και εμφάνισαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα HDL-χοληστερόλης και απολιποπρωτεΐνης AI του ορού καθώς και σημαντικά υψηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων ορού. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των

δύο ομάδων της μελέτης όσον αφορά το δείκτη μάζας σώματος, επίπτωση της αρτηριακής υπέρτασης, καπνίσματος και του οικογενειακού ιστορικού πρώιμης καρδιαγγειακής νόσου. Επιπρόσθετα δεν παρατηρήθηκαν διαφορές όσον αφορά τα επίπεδα ολικής, LDL και nonHDL χοληστερόλης ορού, της apoB, apoE και της Lp(a).

Στον Πίνακα 3 παρουσιάζεται η σύγκριση της σύστασης των HDL σωματιδίων στις δύο ομάδες των ασθενών της μελέτης. Τα συστατικά τα οποία υπολογίστηκαν από το φάσμα NMR είναι: χοληστερόλη (ολική, ελεύθερη και εστεροποιημένη), τριγλυκερίδια και φωσφολιπίδια (ολικά, φωσφατιδυλοχολίνη και σφιγγομυελίνη). Επίσης υπολογίστηκαν ο βαθμός ακορεστότητας και το μήκος της αλυσίδας των λιπαρών οξέων, το σύνολο των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων καθώς και τα λιπαρά οξέα λινελαϊκό, εικοσιδυενοϊκό (DHA) και το άθροισμα αραχιδονικού και εικοσιπεντενοϊκού (ARA + EPA). Οι ασθενείς με νόσο τριών αγγείων παρουσιάζουν χαμηλότερη κατά 17% συγκέντρωση HDL-χοληστερόλης, κυρίως εστεροποιημένης, σε σύγκριση με τους

**Πίνακας 2.** Κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των ασθενών της μελέτης

	Ασθενείς με νόσο τριών αγγείων (n=50)	Ασθενείς με φυσιολογικά αγγεία (n=41)
Ηλικία (έτη)	67,7 ± 9,9 *	61,2 ± 9,6
Άνδρες/Γυναίκες	42/8	25/16
<i>Παράγοντες κινδύνου για στεφανιαία νόσο</i>		
Υπέρταση (n,%)	31 (62,0 %)	22 (53,7%)
Ενεργοί καπνιστές (n,%)	18 (36,0%)	14 (34,1%)
Κληρονομικό ιστορικό πρώιμης καρδιαγγειακής νόσου (n,%)	3 (6,0%)	5 (12,1%)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26,9 ± 2,37	27,8 ± 2,24
<i>Λιπιδαιμικό προφίλ</i>		
Ολική χοληστερόλη (mmol/L)	5,20 ± 1,20	5,53 ± 1,39
LDL χοληστερόλη (mmol/L)	3,33 ± 1,04	3,64 ± 1,12
HDL χοληστερόλη (mmol/L)	1,04 ± 0,22*	1,25 ± 0,31
NonHDL χοληστερόλη (mmol/L)	4,16 ± 1,05	4,28 ± 1,17
Τριγλυκερίδια (mmol/L)	1,77 ± 0,65 <sup>#</sup>	1,38 ± 0,51
Απολιποπρωτεΐνη AI (mg/dl)	103,32 ± 26,41 <sup>#</sup>	134,72 ± 24,28
Απολιποπρωτεΐνη B (mg/dl)	93,19 ± 27,31	99,43 ± 26,76
Απολιποπρωτεΐνη E (mg/dl)	32,39 ± 10,47	37,88 ± 13,53
Lp(a) (mg/dl)		
Ενδιάμεση τιμή (εύρος)	27,6 (2,5-102)	34,6 (9,5-167)

\*p&lt;0,01, # p&lt;0,001 σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου

**Πίνακας 3.** Σύσταση των HDL λιποπρωτεϊνών των ομάδων της μελέτης

Παράμετρος (mmol/L)	Ασθενείς με νόσο τριών αγγείων n=50	Ασθενείς με φυσιολογικά αγγεία n=41	p	%
Ολική χοληστερόλη	1,04 ± 0,22	1,25 ± 0,31	<0,01	↓ 17
Ελεύθερη	0,25 ± 0,06	0,29 ± 0,08	<0,05	↓ 14
Εστεροποιημένη	0,79 ± 0,18	0,95 ± 0,24	<0,01	↓ 17
Τριγλυκερίδια	0,31 ± 0,10	0,26 ± 0,09	<0,05	↑ 19
Ολικά φωσφολιπίδια	1,11 ± 0,27	1,39 ± 0,27	<0,05	↓ 20
Φωσφατιδυλοχολίνη	0,90 ± 0,23	1,11 ± 0,25	<0,05	↓ 19
Σφριγγομυελίνη	0,21 ± 0,04	0,25 ± 0,06	<0,01	↓ 16
Λιπαρά οξέα				
Βαθμός ακορεστότητας	1,35 ± 0,13	1,36 ± 0,08	NS	↓ 1
Μέσο μήκος αλυσίδας	18,59 ± 1,93	18,43 ± 1,40	NS	↑ 1
Πολυακόρεστα	2,96 ± 0,69	3,39 ± 0,69	<0,05	↓ 13
Λινελαϊκό οξύ	0,93 ± 0,21	1,03 ± 0,20	<0,05	↓ 19
Εικοσιδυενοϊκό οξύ	0,17 ± 0,06	0,16 ± 0,05	NS	↑ 1
(ARA + EPA)*	0,49 ± 0,15	0,58 ± 0,16	<0,05	↓ 16

(\*) : αραχιδονικό και εικοσιπεντενοϊκό οξύ



ασθενείς με φυσιολογικά αγγεία ενώ η ποσότητα των τριγλυκεριδίων στα HDL σωματίδια είναι αυξημένη κατά 19%. Η ποσότητα των ολικών φωσφολιπιδίων μειώνεται κατά 20% στους ασθενείς με νόσο τριών αγγείων κυρίως λόγω της κατά 19% μείωση της φωσφατιδυλοχολίνης ενώ η μείωση της σφιγγομυελίνης είναι παρόμοια με αυτή που παρατηρείται στη χοληστερόλη. Η ποσότητα των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων ήταν σημαντικά μειωμένη σε ασθενείς με νόσο τριών αγγείων σε σύγκριση με τα άτομα με φυσιολογικά αγγεία καθώς και των λιπαρών οξέων λινελαϊκού, αραχιδονικού και εικοσιπεντενοϊκού.

Στον Πίνακα 4 παρουσιάζεται η σύγκριση της σύστασης των nonHDL σωματιδίων η οποία δεν διαφοροποιείται σημαντικά μεταξύ των δυο ομάδων των ασθενών της μελέτης. Οι κύριες διαφορές που παρατηρούνται είναι η σημαντική αύξηση της ποσότητας των τριγλυκεριδίων (28%) και η μείωση της ποσότητας των λιπαρών οξέων εικοσιδυενοϊκού, αραχιδονικού και εικοσιπεντενοϊκού στους ασθενείς με νόσο τριών αγγείων σε σύγκριση με τους ασθενείς με φυσιολογικά αγγεία.

Στον Πίνακα 5 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της πολυπαραγοντικής ανάλυσης μετά από προσαρμογή για όλους τους παράγοντες κινδύνου. Προέκυψε λοιπόν ότι οι κύριοι εκτιμητές της παρουσίας εκτεταμένης στεφανιαίας νόσου ήταν η εστεροποιη-

μένη χοληστερόλη των HDL σωματιδίων και η % περιεκτικότητα των nonHDL σωματιδίων σε αραχιδονικό και εικοσιπεντενοϊκό οξύ.

### Συζήτηση

Κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι επιμέρους μεταβολές στη σύσταση των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων συσχετίζονται με την παρουσία και την σοβαρότητα της καρδιαγγειακής νόσου.<sup>4-7, 16-19</sup> Οι καθιερωμένες τεχνικές για την ανάλυση της σύστασης των λιποπρωτεϊνικών σωματιδίων είναι επίπονες και χρονοβόρες και επομένως ακατάλληλες για μεγάλες κλινικές μελέτες. Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπία NMR για τη γρήγορη και συνολική διερεύνηση της σύστασης των HDL και nonHDL λιποπρωτεϊνών ασθενών με νόσο τριών αγγείων σε σύγκριση με άτομα με φυσιολογικά αγγεία.

Οι κύριες διαφορές στη σύσταση των HDL λιποπρωτεϊνών μεταξύ των δύο ομάδων της μελέτης ήταν η αυξημένη περιεκτικότητα σε τριγλυκερίδια και η μειωμένη περιεκτικότητα σε εστέρες χοληστερόλης, φωσφατιδυλοχολίνη και σφιγγομυελίνη καθώς και σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα όπως το λινελαϊκό, αραχιδονικό και εικοσιπεντενοϊκό.

Μελέτες σε ανασυσταμένα HDL σωματίδια έχουν δείξει ότι αυξημένη περιεκτικότητα τριγλυκεριδίων του πυρήνα των σωματιδίων έχει αρνητική επίδραση

**Πίνακας 4.** Σύσταση των nonHDL λιποπρωτεϊνών των ομάδων της μελέτης

Παράμετρος (mmol/L)	Ασθενείς με νόσο τριών αγγείων n=50	Ασθενείς με φυσιολογικά αγγεία n=41	p	%
Ολική χοληστερόλη	4,16 ± 1,05	4,28 ± 1,17	NS	↓ 3
Ελεύθερη	1,33 ± 0,33	1,34 ± 0,34	NS	↓ 1
Εστεροποιημένη	2,82 ± 0,74	2,94 ± 0,84	NS	↓ 4
Τριγλυκερίδια	2,83 ± 1,22	2,21 ± 0,90	<0,05	↑ 28
Ολικά φωσφολιπίδια	1,73 ± 0,42	1,68 ± 0,42	NS	↑ 3
Φωσφατιδυλοχολίνη	1,17 ± 0,32	1,11 ± 0,29	NS	↑ 5
Σφιγγομυελίνη	0,56 ± 0,14	0,57 ± 0,15	NS	↓ 2
Λιπαρά οξέα				
Βαθμός ακορεστότητας	1,24 ± 0,07	1,26 ± 0,07	NS	↓ 2
Μέσο μήκος αλυσίδας	16,28 ± 0,59	16,47 ± 0,91	NS	↓ 1
Πολυακόρεστα	5,87 ± 1,39	5,93 ± 1,58	NS	↓ 1
Λινελαϊκό οξύ	2,47 ± 0,79	2,46 ± 0,64	NS	-
Εικοσιδυενοϊκό οξύ	0,16 ± 0,08	0,19 ± 0,11	<0,05	↓ 16
(ARA + EPA)*	0,80 ± 0,26	1,01 ± 0,35	<0,01	↓ 21

(\*): αραχιδονικό και εικοσιπεντενοϊκό οξύ

**Πίνακας 5.** Αποτελέσματα πολυπαραγοντικής ανάλυσης

Παράμετρος	OR	95%CI	p
HDL			
Εστεροποιημένη χοληστερόλη nonHDL	0,009	0,001-0,138	0,001
ARA + EPA	0,730	0,614-0,867	0,0001

στη σταθερότητα του σωματιδίου ενώ η σταθερότητα αυξάνει όταν ο πυρήνας εμπλουτίζεται σε εστεροποιημένη χοληστερόλη. Επιπρόσθετα, τα ουδέτερα λιπίδια του πυρήνα επηρεάζουν το φορτίο της επιφάνειας και τη δομή του σωματιδίου. Τα τριγλυκερίδια μειώνουν τη σταθερότητα της α-έλικας της apoAI και αυξάνουν την τάση της να αποσυνδεθεί από το σωματίδιο και να απομακρυνθεί από το πλάσμα ενώ η εστεροποιημένη χοληστερόλη αυξάνει τη σταθερότητα της έλικας.<sup>20,21</sup>

Η μειωμένη ποσότητα των φωσφολιπιδίων, σφιγγομυελίνης και φωσφατιδυλοχολίνης που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη βρίσκεται σε συμφωνία με πρόσφατες κλινικές μελέτες που έδειξαν ότι η ποσότητα των φωσφολιπιδίων των HDL λιποπρωτεϊνών ασθενών με στεφανιαία νόσο είναι μειωμένη σε σύγκριση με άτομα με φυσιολογικά αγγεία και παρουσιάζει ισχυρότερη συσχέτιση με τη σοβαρότητα της νόσου από ό,τι η HDL-χοληστερόλη.<sup>4-7</sup> Επιπρόσθετα πειραματικές μελέτες επισημαίνουν τον σημαντικό ρόλο των φωσφολιπιδίων στο μεταβολισμό των λιποπρωτεϊνών. Η σφιγγομυελίνη επηρεάζει τη δομή και τη σταθερότητα των δισκοειδών και σφαιρικών HDL σωματιδίων<sup>22</sup> και ο εμπλουτισμός των σωματιδίων σε σφιγγομυελίνη αυξάνει την ικανότητα ροής χοληστερόλης του πλάσματος (cholesterol efflux capacity).<sup>23,24</sup> Επίσης, η ικανότητα των HDL σωματιδίων να αναστέλλουν την προσκόλληση των μονοκυττάρων στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων μειώνοντας την έκφραση των μορίων προσκόλλησης E-selectin, ICAM-1, VCAM-1 οφείλεται στην παρουσία φωσφατιδυλοχολίνης που στο μόριό της έχει πολυακόρεστα λιπαρά οξέα.<sup>25,26</sup>

Τα μειωμένα επίπεδα πολυακόρεστων λιπαρών οξέων που παρατηρήθηκαν στην παρούσα μελέτη, τόσο στο κλάσμα της HDL όσο και στο κλάσμα της nonHDL, βρίσκονται σε συμφωνία με τα ευρήματα μεγάλων επιδημιολογικών μελετών στις οποίες επισημαίνεται ο ευεργετικός ρόλος των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στην πρόληψη του κινδύνου εμφάνισης στεφανιαίας νόσου.<sup>27-29</sup>

Η μελέτη αυτή εμφανίζει συγκεκριμένους πε-

ριορισμούς. Χαρακτηρίζεται από σχετικά μικρό αριθμό ασθενών ανά ομάδα πληθυσμού της μελέτης. Επιπρόσθετα, η σύγκριση γίνεται μεταξύ ασθενών με φυσιολογικά αγγεία και ασθενών με 3-αγγειακή νόσο ενώ οι ασθενείς με μέσης έκτασης νόσο (ενός ή δυο αγγείων) αποκλείονται. Η επιλογή αυτή έγινε έτσι ώστε οι τυχόν διαφορές μεταξύ των ομάδων να γίνουν περισσότερο εμφανείς και στηρίχθηκε στην υπόθεση ότι οι διαφορές στη σύσταση των λιποπρωτεϊνών πιθανά εξαρτώνται όχι μόνο από την ύπαρξη αλλά και από την έκταση της στεφανιαίας νόσου. Ο χαρακτηρισμός των ασθενών με μέσης έκτασης νόσο θα πρέπει να αποτελεί αντικείμενο μελλοντικών μελετών.

Συμπερασματικά, η ανάλυση των λιπιδίων με φασματοσκοπία NMR είναι μια γρήγορη τεχνική η οποία μπορεί να συμβάλει στην καλύτερη κατανόηση των μεταβολών της σύστασης των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος που οφείλονται σε παθολογικούς ή γενετικούς παράγοντες, στη διερεύνηση της αποτελεσματικότητας της δίαιτας και της θεραπευτικής αγωγής καθώς επίσης και να αναδείξει ως νέους αθηρογόνους δείκτες, συστατικά τα οποία δεν προσδιορίζονται με τις καθιερωμένες βιοχημικές μεθόδους. Επίσης, μπορεί να διευρύνει πέραν της χοληστερόλης, τον έλεγχο της επίδρασης της υπολιπιδαιμικής αγωγής. Η συλλογή δεδομένων από ένα μεγαλύτερο αριθμό ασθενών θα μπορούσε πιθανά να οδηγήσει στη δημιουργία μιας αξιόπιστης βάσης δεδομένων που θα αφορά τη νόσο.

## Βιβλιογραφία

1. Sparks DL, Davidson WS, Lund-Katz S, Phillips MC: Effects of the neutral lipid content of high density lipoprotein on apolipoprotein A-I structure and particle stability. *J Biol Chem* 1995; 270: 26910-26967.
2. Bagdade JD, Buchanan WF, Pollare T, Lithell H: Abnormal lipoprotein phospholipid composition in patients with essential hypertension. *Atherosclerosis* 1995; 117: 209-215.
3. Hasselwander O, McEneny J, McMaster D, et al: HDL composition and HDL antioxidant capacity in patients on regular haemodialysis. *Atherosclerosis* 1999; 143: 125-133.
4. Naito HK, Greenstreet RL, David JA, et al: HDL-cholesterol concentration and severity of coronary atherosclerosis determined by cine-angiography. *Artery* 1980; 8: 101-112.
5. Kunz F, Pechlaner C, Erhart R, Fend F, Muhlberger V: HDL and plasma phospholipids in coronary artery disease. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 1146-1150.
6. Piperi C, Kalofoutis C, Papaevaggeliou D, Papapanagiotou A, Lekakis J, Kalofoutis A: The significance of serum HDL phospholipid levels in angiographically defined coronary artery disease. *Clin Biochem* 2004; 37: 377-381.
7. Horter MJ, Sondermann S, Reinecke H, et al: Associations of HDL phospholipids and paraoxonase activity with coro-

- nary heart disease in postmenopausal women. *Acta Physiol Scand* 2002; 176: 123-130.
8. Cushley RJ, Okon Mark: NMR studies of lipoprotein structure. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2002; 31: 177-206.
  9. Otvos JD: Measurement of lipoprotein subclass profiles by nuclear magnetic resonance spectroscopy. In: Rifai N, Warnick GR, Dominiczak MH (ed) *Handbook of lipoprotein testing*. AACC Press, Washington 1997; 497-508.
  10. Brindle JT, Antti H, Holmes E, et al: Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using <sup>1</sup>H-NMR-based metabolomics. *Nat Med* 2002; 8: 1439-1444.
  11. Warnick GR, Benderson J, Albers JJ: Dextran sulfate-Mg<sup>2+</sup> precipitation procedure for quantitation of high-density-lipoprotein cholesterol. *Clin Chem* 1982; 28: 1379-1388.
  12. Bligh EG, Dyer WJ: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959; 37: 911-917.
  13. Sparling ML, Zidovetzki R, Muller L, Chan SI: Analysis of membrane lipids by 500MHz <sup>1</sup>H NMR. *Anal Biochem* 1989; 178: 67-76.
  14. Kriat M, Vion-Dury J, Confort-Gouny S, et al: Analysis of plasma lipids by NMR spectroscopy: application to modifications induced by malignant tumors. *J Lipid Res* 1993; 34: 1009-1019.
  15. Noula C, Bonzom P, Brown A, Gibbons WA, Martin J, Nicolaou A: <sup>1</sup>H-NMR lipid profiles of human blood platelets; links with coronary artery disease. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1487: 15-23.
  16. Tsironis LD, Katsouras CS, Goudevenos JA, Michalis LM, Elisaf MS, Sideris DA, Tselepis AD. Lipoprotein(a)-Associated PAF-Acetylhydrolase Activity in Patients with Coronary Artery Disease. *Hellenic J Cardiol* 2003; 44: 32-37.
  17. Lee J, Leeson PC. Lipoproteins and the endothelium: past, present and future. *Hellenic J Cardiol* 2006; 47: 158-159.
  18. Antoniadis C, Tousoulis D, Marinou K, Stefanadi E, Ntarladimas I, Latsios G, Konniari K, Papageorgiou N, Siasos G, Stefanadis C. Effects of lipid profile on forearm hyperemic response in young subjects. *Hellenic J Cardiol* 2006 May-Jun; 47: 152-157.
  19. Kolovou GD, Anagnostopoulou KK, Salpea KD, Hoursalas IS, Petropoulos I, Bilianou HI, Damaskos DS, Gianakopoulou VN, Cokkinos DV. Influence of triglycerides on other plasma lipids in middle-aged men intended for hypolipidaemic treatment. *Hellenic J Cardiol* 2006; 47: 78-83.
  20. Sparks DL, Davidson WS, Lund-Katz S, Phillips MC: Effects of the neutral lipid content of high density lipoprotein on apolipoprotein A-I structure and particle stability. *J Biol Chem* 1995; 270: 26910-26917.
  21. Curtiss LK, Bonnet DJ, Rye KA. The conformation of apolipoprotein A-I in high density lipoproteins is influenced by core lipid composition and particle size: a surface plasmon resonance study. *Biochemistry* 2000; 39: 5712-5721.
  22. Rye KA, Hime NJ, Barter PJ. The influence of sphingomyelin on the structure and function of reconstituted high density lipoproteins. *J Biol Chem* 1996; 271: 4243-4250.
  23. Fournier N, Paul JL, Atger V, et al: HDL phospholipid content and composition as a major factor determining cholesterol efflux capacity from Fu5AH cells to human serum. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2685-2691.
  24. Yancey PG, de la Llera-Moya M, Swarnakar S, et al: High density lipoprotein phospholipid composition is a major determinant of the bi-directional flux and net movement of cellular free cholesterol mediated by scavenger receptor BI. *J Biol Chem* 2000; 275: 36596-36604.
  25. Nofer JR, Walter M, Assmann G: Current understanding of the role of high-density lipoproteins in atherosclerosis and senescence. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2005; 3: 1063-1078.
  26. Koulouris SN: HDL-Cholesterol: Pro-Inflammatory and Anti-Inflammatory Effects. *Hellenic J Cardiol* 2004; 45: 324-330.
  27. Ascherio A. Epidemiological studies on dietary fats and coronary heart disease. *Am J Med* 2002; 113: 9S-12S.
  28. Von Schacky C. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2004; 7: 131-136.
  29. Lopez-Garcia E, Schulze MB, Manson JE, et al: Consumption of (n-3) fatty acids is related to plasma biomarkers of inflammation and endothelial activation in women. *J Nutr* 2004; 134: 1806-1811.