

VYŠETŘENÍ METABOLISMU LIPIDŮ A CHOLESTEROLU

Úvod

Problematika poruch lipidového metabolismu se dostává do popředí zájmu především v souvislosti s prevencí a léčbou kardiovaskulárních onemocnění.

Základní lipidové vyšetření zahrnuje analýzu triacylglycerolů, celkového cholesterolu, HDL-cholesterolu a z nich vypočtené koncentrace LDL-cholesterolu a non-HDL cholesterolu. Vyšetření je doplněno chylomikronovým testem a někdy analýzou fosfolipidů a elektroforézou lipoproteinů.

Hyperlipidemie je stav spojený se zvýšením hladiny lipidů v krvi. Může se jednat o hypercholesterolemii, hypertriacylglycerolemii, popř. kombinaci obou stavů (smíšená hyperlipidemie).

Hyperlipoproteinemie je stav spojený se zvýšením hladiny jedné nebo více tříd lipoproteinů. Často se ale zvýšení některé frakce krevních lipidů kombinuje se snížením koncentrace HDL cholesterolu, používá se proto též termín dyslipoproteinemie.

Laboratorní diagnostika poruch lipidového metabolismu se musí opírat o vyšetření krevních lipidů z alespoň dvou odběrů krve v rozmezí 2–8 týdnů, za běžného životního stylu. U jednotlivých parametrů se zjistí kritické rozdíly a pokud jsou nižší než přípustné hodnoty, vypočte se aritmetický průměr pro každý analyt. V případě překročení kritického rozdílu se provede třetí vyšetření.

Kritický rozdíl hodnot pro parametry lipidového metabolismu:

Analyt	Kritický rozdíl (%)
Celkový cholesterol	> 20
LDL-cholesterol	> 25
HDL-cholesterol	> 25
Triacylglyceroly	> 65

Je třeba rovněž vzít v úvahu, že vyšetření lipidového metabolismu je významně ovlivněno životním stylem (dietní návyky, pohybová aktivita, tělesná hmotnost), farmakoterapií (hormonální antikoncepce, hormonální substituční léčba ad.) a probíhajícím akutním nebo nekompensovaným onemocněním. Proto vyšetření krevních lipidů nemá být prováděno tehdy, kdy lze předpokládat, že výsledek nebude vypovídat o situaci za běžného životního stylu (krátce po dovolené, při hospitalizaci z jiných důvodů, akutním diabetes mellitus, v těhotenství a půl roku po něm atd.).

1.1 Stanovení celkového cholesterolu v séru a krvi

Cholesterol je v krevní plazmě transportován jako součást lipoproteinů, z největší části ve frakci LDL, méně v HDL a VLDL. Z tohoto cholesterolu jsou přibližně dvě třetiny esterifikovány vyššími mastnými kyselinami, zbytek je neesterifikován.

1.1.1 Enzymové stanovení cholesterolu v séru

Estery cholesterolu jsou štěpeny cholesterolesterázou na cholesterol a mastné kyseliny. Cholesterol je pak dalším enzymem cholesteroxidázou oxidován na cholestenon. Současně vzniká peroxid vodíku, který za katalýzy peroxidázou reaguje s 4-aminofenazonem a fenolem na červeně zbarvený produkt.

Zapište rovnice reakcí popsaných výše

Paralelně se vzorky je měřen standard, jehož koncentrace je c_{st} . Zapište vztah pro výpočet koncentrace cholesterolu ve vzorku séra.

Hodnocení

Podle doporučení pro diagnostiku a léčbu hyperlipoproteinemií v dospělosti, vypracované výborem České společnosti pro aterosklerózu, má být provedeno vyšetření cholesterolu 1krát za pět let u všech dospělých osob mezi 20–75 lety při preventivní prohlídce. Je-li koncentrace celkového cholesterolu < 5 mmol/l, má být provedena další kontrola cholesterolu za 5 let.

Zjištěné hodnoty koncentrace cholesterolu > 5 mmol/l by měly být důvodem k dalšímu vyšetření metabolismu lipidů, zvláště rozložení cholesterolu v lipoproteinových frakcích. Zvýšená koncentrace cholesterolu se často nachází u diabetiků nebo u hypotyreózy, snížená např. u pokročilých jaterních cirhóz nebo hypertyreózy.

1.2 Stanovení triacylglycerolů v krvi

Stanovení triacylglycerolů (TG) patří mezi základní vyšetření lipidového metabolismu.

Nejčastěji se používá enzymová fotometrická metoda. Triacylglyceroly jsou štěpeny lipoproteinovou lipasou a glycerol a volné mastné kyseliny:

Doplňte rovnici:

.....

Glycerol je fosforylován ATP za katalýzy glycerolkinasou na glycerol-3-fosfát a vzniká ADP. Glycerol-3-fosfát se katalyticky oxiduje glycerolfosfát oxidázou na dihydroxyacetonfosfát a vzniká peroxid vodíku.

Napište rovnice reakcí popsaných výše a pokuste se doplnit, jaký bude další postup.

Jinou modifikací stanovení je využití druhého produktu v glycerolkinázové reakci, tj. ADP.

ADP reaguje s fosfoenolpyruvátém za katalýzy pyruvátkinasy. Vzniklý pyruvát je redukován na laktát pomocí laktátdehydrogenasy.

Co bude měřeno v této reakci ?

Toto stanovení probíhá s jedním roztokem a může být využito v automatických analyzátoch.

Napište, které enzymy bude obsahovat reakční činidlo.

Hodnocení

Koncentrace triacylglycerolů v séru u zdravé populace (cílová hladina) má být menší než 2 mmol/l. Vzorky plazmy s koncentrací TG vyšší než 3,4 mmol/l opaleskují, při hladinách TG nad 11,3 mmol/l jsou přítomny chylomikrony a plazma je mléčně zakalená. Při terapii se klade velký důraz na dietu s nízkým obsahem tuků a cukrů, na zvýšenou tělesnou aktivitu, dostatek antioxidantů v potravě a na celkovou hypolipidemickou léčbu.

Z hlediska rizika rozvoje aterosklerózy jsou v současné době rozlišovány tři základní typy hyperlipidemií*:

I.	Izolovaná hypercholesterolemie (izolované zvýšení celkového cholesterolu)
II.	Izolovaná hypertriacylglycerolemie (izolované zvýšení cholesterolu i triacylglycerolů)
III.	Kombinovaná hyperlipidemie (současné zvýšení cholesterolu i triacylglycerolů)

*klasifikace dle Fredricksona se již nepoužívá

Pro přesnější hodnocení rizika je třeba rozlišit podíl jednotlivých typů lipoproteinů na poruše lipidového metabolismu.

1.3 Stanovení HDL-cholesterolu a výpočet LDL-cholesterolu

Vysoký podíl z celkového cholesterolu séra vázaný v HDL-lipoproteinech se pokládá za známku dobré schopnosti vyloučit nežádoucí nadbytek cholesterolu z organismu. Naopak, hodnoty LDL-cholesterolu jsou mírou aterogenní hypercholesterolemie.

Stanovení HDL-cholesterolu (HDL_{Chol}) bylo dříve založeno na tom, že přidáním vhodného precipitačního činidla (např. kyseliny fosfowolframové s $MgCl_2$ nebo heparinu s $MnCl_2$) k séru, se vysrážely chylomikrony, VLDL a LDL. Po centrifugaci se stanovila koncentrace cholesterolu v HDL,

kteře zůstaly v supernatantu. Nejnovějšími metodami lze stanovit HDL-cholesterol přímo v séru bez předchozí precipitace ostatních lipoproteinových částic.

Uveďte, zda takovou metodu v laboratoři používáte a jaký je její princip.

Ze známých hodnot HDL-cholesterolu, celkového cholesterolu ($\text{Chol}_{\text{Celk}}$) a triacylglycerolů (TG) lze přibližně vypočítat hodnotu LDL-cholesterolu (LDL_{Chol}) pomocí **Friedewaldova vzorce**:

$$\text{LDL}_{\text{Chol}} = \text{Chol}_{\text{Celk}} - \text{TG}/2,2 - \text{HDL}_{\text{Chol}} \quad (\text{mmol/l})$$

Vzorec vychází z předpokladu, že ve většině sér nalačno chybí chylomikrony a že stanovené triacylglyceroly pocházejí převážně z VLDL, v nichž molární poměr TG/Chol má hodnotu 2,2. Uvedený vztah lze použít jen v případě, že koncentrace triacylglycerolů v séru je nižší než 4,5 mmol/l.

Další odvozené parametry lipidového metabolismu

Cílem těchto výpočtů je zpřesnit stanovení rizika, které vyplývá z naměřených hodnot krevních lipidů.

Index $\text{Chol}_{\text{Celk}}/\text{HDL}_{\text{Chol}}$. Index zohledňuje fakt, že zvýšený HDL_{Chol} je „negativní rizikový faktor“, snižující riziko ischemické choroby srdeční (ICHS). Současné zvýšení celkového i HDL cholesterolu nemusí riziko ICHS zvyšovat. Jeho hodnota má být < 5 .

Non-HDL $_{\text{Chol}}$ ($\text{Non-HDL}_{\text{Chol}} = \text{Chol}_{\text{Celk}} - \text{HDL}_{\text{Chol}}$). Tento parametr zohledňuje koncentraci všech aterogenních lipoproteinů. Lze jej použít v případech, kdy výpočet LDL-cholesterolu není možný pro zvýšené hodnoty triacylglycerolů. Jeho hodnota má být $< 3,8$.

Hodnocení

Cílové (žádoucí) hodnoty krevních lipidů běžné populace

$\text{Chol}_{\text{Celk}}$ (mmol/l)	LDL_{Chol} (mmol/l)	TG (mmol/l)	HDL_{Chol} (mmol/l)	Index $\text{Chol}_{\text{Celk}}/\text{HDL}_{\text{Chol}}$	Non-HDL $_{\text{Chol}}$
$< 5,0$	$< 3,0$	$< 2,0$	$> 1,0$	< 5	$< 3,8$

Je-li některá ze zjištěných hodnot zvýšená, provádí se další vyšetření, jejichž cílem odhalit příčiny poruchy lipidového metabolismu a určit míru rizika vzniku ICHS.

1.4 Chylomikronový test

Měření koncentrace chylomikronů není běžně prováděno. Ve vzorcích odebraných po 12 hodinovém lačnění by se neměly vyskytovat. Pro jejich přítomnost svědčí silná chylozita séra. K důkazu lze provést chylomikronový test.

☞ Sérum je po odběru skladováno při 4 °C po dobu 12 hodin. Během této doby flotují eventuálně přítomné chylomikrony k hladině vzorku. Jejich přítomnost se projeví opalescentním až bílým prstencem.

1.5 Elektroforéza lipoproteinů v séru

Elektroforézu lze využít při rozdělení lipoproteinů krevní plazmy na jednotlivé frakce. Lipoproteiny se rozdělují na základě jejich rozdílné pohyblivosti ve stejnosměrném elektrickém poli. Po elektroforéze na agarosovém gelu jsou polohy frakcí identifikovány obarvením Sudanovou černí.

Materiál: Souprava Hydragel LIPO + Lp(a) od firmy Sebia obsahující: 0,05 mol/l Tris-barbitalový pufr pH 8,75 (připraven naředěním 22,5 ml zásobního roztoku ze soupravy demi-vodou na 300 ml), roztok Sudanové černi (2 ml 6% roztoku ze soupravy do 160 ml ethanolu a 140 ml demi-vody), vzorky séra, ethanol, demi-voda. Fólie s agarosovým gelem, aplikační šablona, mikropipetor 5 μ l, pruhy filtračního papíru, migrační komora CUVE K20, elektrický vysoušeč, zdroj napětí.

Provedení

- ☞ *Příprava gelu.* Z obalu vyjměte fólii s agarosovým gelem a položte ji na filtrační papír lícovou stranou nahoru. Do místa aplikace vzorků (v rovině šipek) položte na několik sekund pás filtračního papíru ze soupravy z důvodu odsátí přebytečné vlhkosti.
- ☞ *Aplikace vzorků* Do roviny šipek opatrně položte aplikační šablunku a do výřezů v šablonce odměřujte po 5 μ l vzorků séra. Nechejte vsakovat 5–10 min, potom odsajte nevsáklá séra pruhem filtračního papíru a sejměte šablunku.
- ☞ *Elektroforetická separace.* Do migrační komory odměřte ke každé elektrodě 150 ml pufru a založte agarosovou fólii lícovou stranou dolů (vzorky na straně katody). Migrace probíhá 90 minut za konstantního napětí 50 V (po dosažení tohoto napětí je třeba zkontrolovat proud, který by měl být 30 mA na jednu fólii).
- ☞ *Fixace a barvení.* Po ukončení migrace vysušte gel v proudu horkého vzduchu (max. teplota 80 °C). Na fólii nesmí být po vysušení patrné stopy vlhkosti. Suchou fólii ponořte přesně na 15 min. do lázně s roztokem Sudanové černi. Gel odbarvujte přesně 5 min. ve 45% ethanolu, poté ho umístěte na několik minut do lázně s demi-vodou.
- ☞ *Sušení gelu.* Fólii vysušte v proudu horkého vzduchu nebo při laboratorní teplotě.

Hodnocení

Po elektroforetickém rozdělení zůstávají chylomikrony na startu, LDL (β -lipoproteiny) migrují v pozici β_2 -globulinů, VLDL (pre- β -lipoproteiny) na místě β_1 -globulinů. HDL částice mají nejvyšší pohyblivost a objevují se v pozici α_2 -globulinů.

V poloze mezi α - a β -lipoproteiny (HDL a LDL) se může objevit frakce charakteristická pro lipoprotein (a) – Lp(a) – rizikový faktor pro vznik aterosklerózy a kardiovaskulárních onemocnění. Kvantitativně se stanovuje elektroimunodifuzní technikou.

Elektroforeogram lze vyhodnotit denzitometricky při vlnové délce 580 nm. Výsledek se vyjadřuje v procentech optické hustoty pro jednotlivé frakce vzhledem k celkové barevné ploše. Stanovené

hodnoty spolu s dalšími ukazateli (celkový cholesterol, triacylglyceroly) slouží k charakterizaci hyperlipoproteinemií.

Referenční intervaly:	α -lipoproteiny	23–46 %
	pre- β -lipoproteiny	3–18 %
	β -lipoproteiny	42–63 %

V praxi se provádí také hodnocení pouze vizuální. Biologický nález se srovnává s referenčními hodnotami a výsledek se posuzuje ve smyslu zvýšení (snížení) jednotlivých frakcí.
