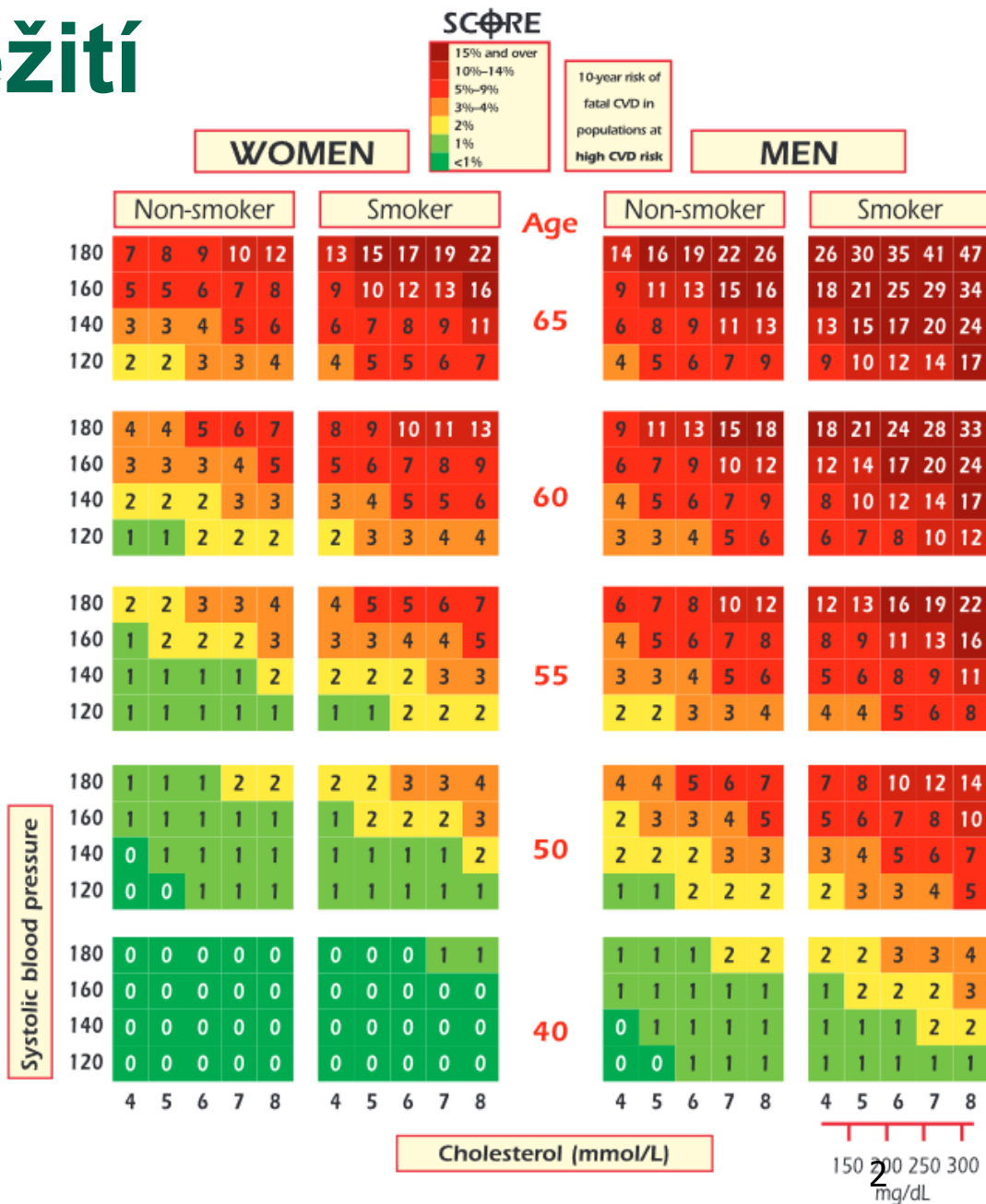


**Lipidy**  
**Lipoproteiny**  
**Apolipoproteiny**

# Desetileté přežití



# Lipidy

Lipos = tuk

- **Význam lipidů v organismu**

1) Zdroj **zásobní energie** alternativní ke glukóze (triacylglyceroly)

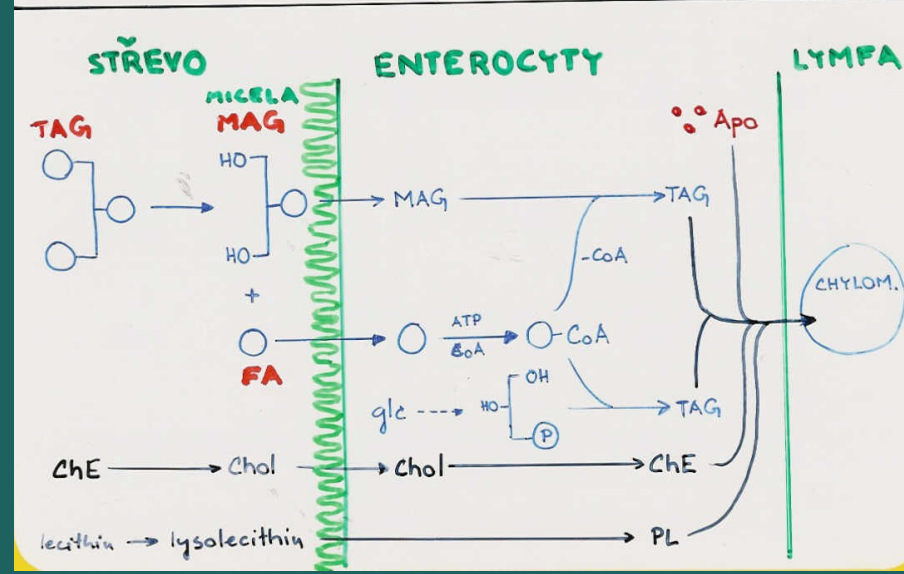
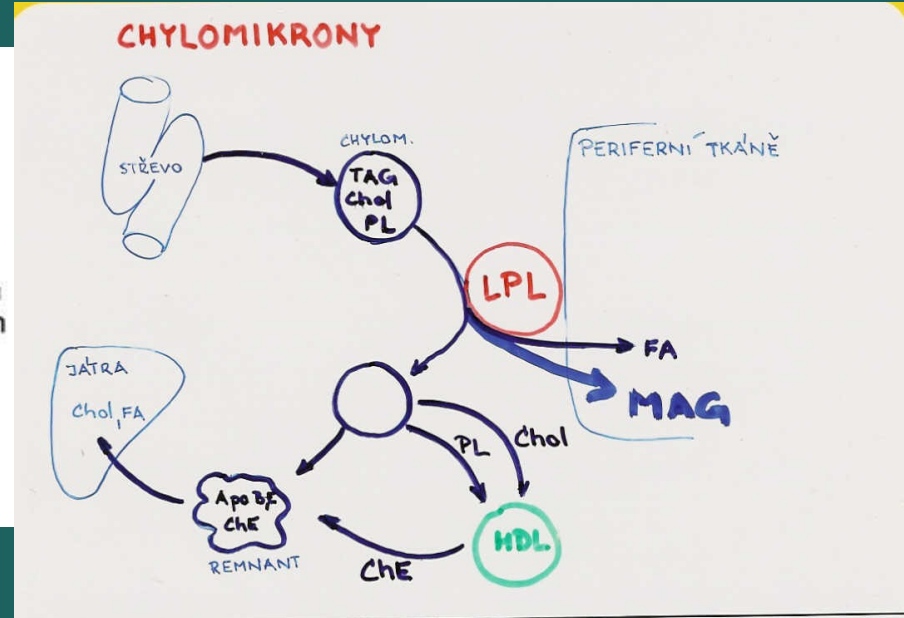
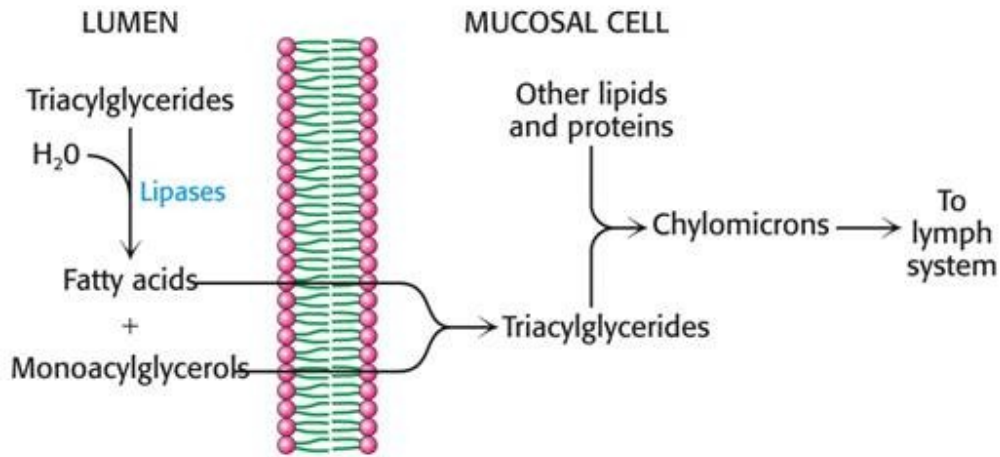
2) **Součást buněčných membrán** (cholesterol, fosfolipidy)

3) Biokatalyzátory, hormony

4) izolační vrstva, ochrana orgánů

- Stanovení koncentrace lipidů v krvi nyní bez významu (referenční rozmezí 4,0 - 8,0 g/l)

# Trávení lipidů



Z webu [orion.chemi.muni.cz](http://orion.chemi.muni.cz)

# Transport lipidů

## I. Krev a lymfatický systém

- Vazba na specifické proteiny (mastné kyseliny na albumin)
- Tvorba makromolekulárních komplexů

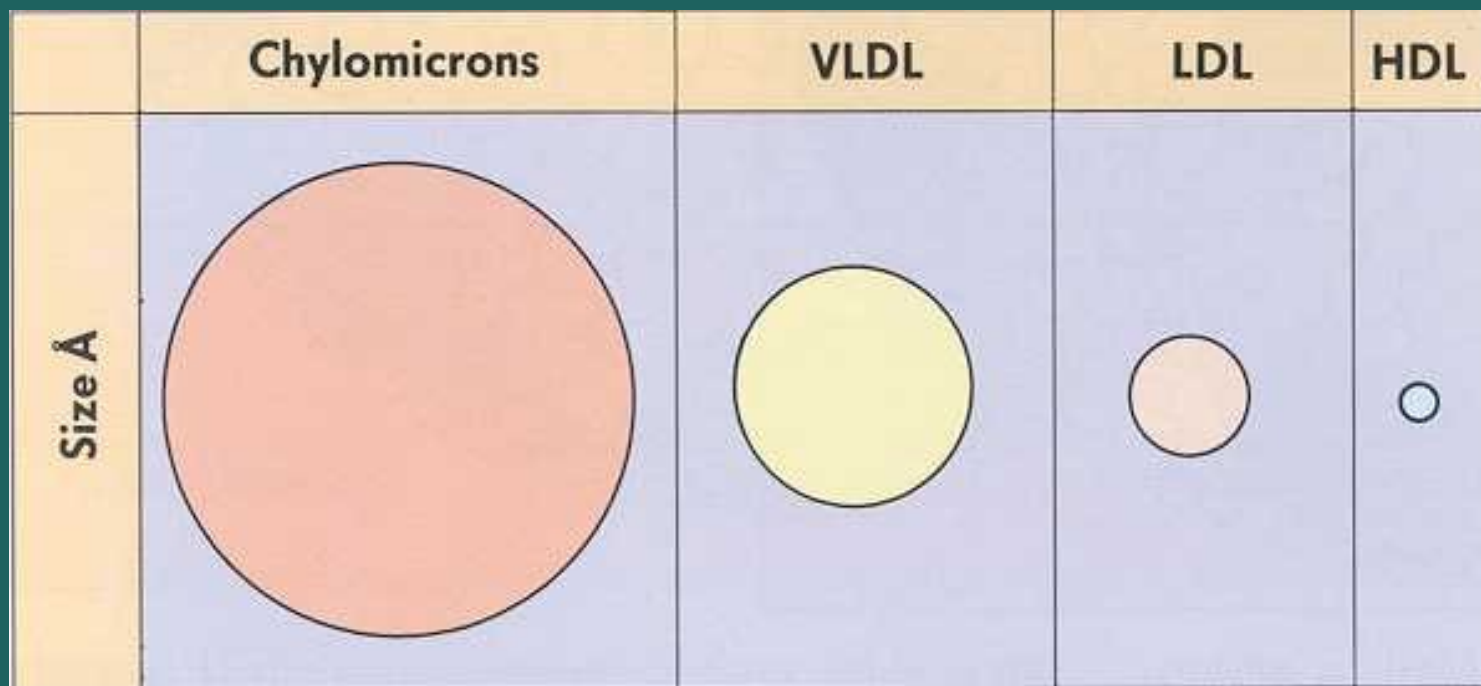
**lipidy + apolipoproteiny = lipoproteiny**

## II. Zásobní lipidy a v buněčných membránách

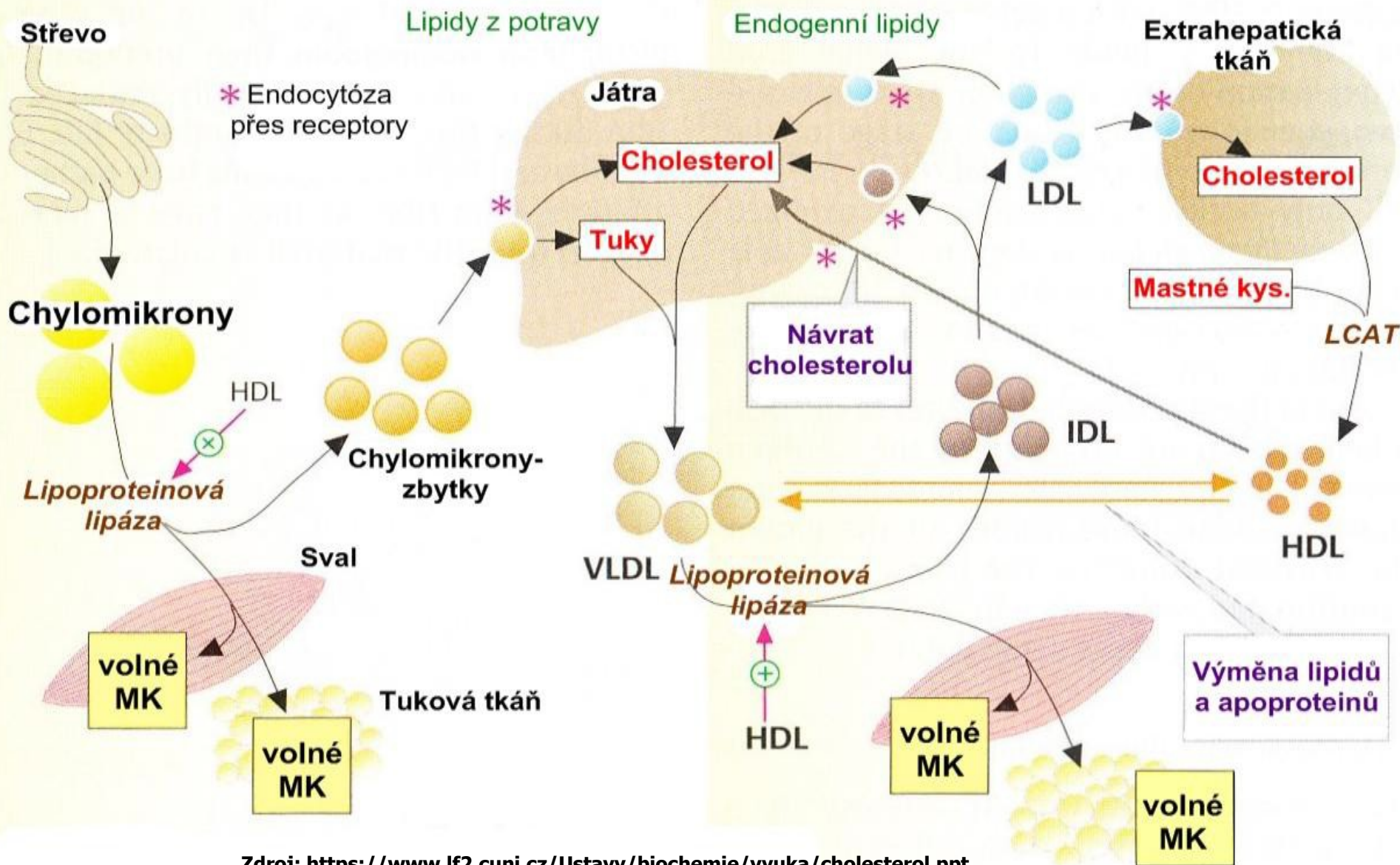
# Rozdělení lipoproteinů

Lp(a)

Ultracentrifugace	Chylomikrony	LDL	IDL	VLDL	HDL
ELFO	Chylomikrony	beta-LP	široké beta-LP	prebeta-LP	alfa-LP
Hustota (kg/l)	< 0,94	1,063	1,019	1,006	>1,21
Velikost (nm)	10 000	220	315	500	85
Obsah CHOL(%)	3	59	41	17	40
Obsah TG(%)	88	7	32	56	6
Obsah proteinů(%)	1	25	18	10	50



# Rozdělení lipoproteinů



# Chylomikrony (CM)

- vznikají v absorpčních **buňkách střevní sliznice**
- nesou TG, CH a lipofilní vitaminy přijaté potravou
- **obsahují apo-B48, stopy apoA** (jiné neumí střevní buňka syntetizovat)
- syntéza apo-B 48 limituje tvorbu CM
- pronikají do lymfy
- prostřednictvím lymfatických cév jsou transportovány do krve



# Jaký je osud chylomikronů v krvi ?

- do krve vstupují 1-2 h po jídle
- z HDL jsou na CM přenášeny Apo E a Apo C<sub>II</sub>
- v krevních kapilárách na CM působí lipoproteinová lipáza

# VLDL

- vznikají v hepatocytech
- nesou cholesterol převážně přijatý potravou a triacylglyceroly syntetizované v játrech
- obsahují ApoB100, malá množství ApoA a ApoC-I a ApoE

# Jaké jsou další změny VLDL?

- V krevních kapilárách působí na VLDL lipoproteinová lipasa
- Triacylglyceroly jsou štěpeny na mastné kyseliny a glycerol
- Z HDL jsou na VLDL přenášeny Apo E a Apo CII
- **VLDL se mění na IDL**
- IDL jsou vychytány játry nebo přeměněny na LDL

# LDL

- vznikají z VLDL a IDL

- oxidované LDL

dlouhý poločas LDL částic způsobuje, že:  
LDL mohou pronikat cévní stěnou → ukládají se v  
intimě → dochází k jejich oxidaci → oxidované LDL

**jsou silně aterogenní**

- „small dense LDL particles“ (malé denzní LDL částice)

LDL-III, 1,04-1,06 g/l, <25 nm

- silně aterogenní, snadněji pronikají arteriální intimou
- špatné rozpoznávání a vychytávání LDL receptory,
- snadno se oxidují

# Jaký je osud IDL a LDL?

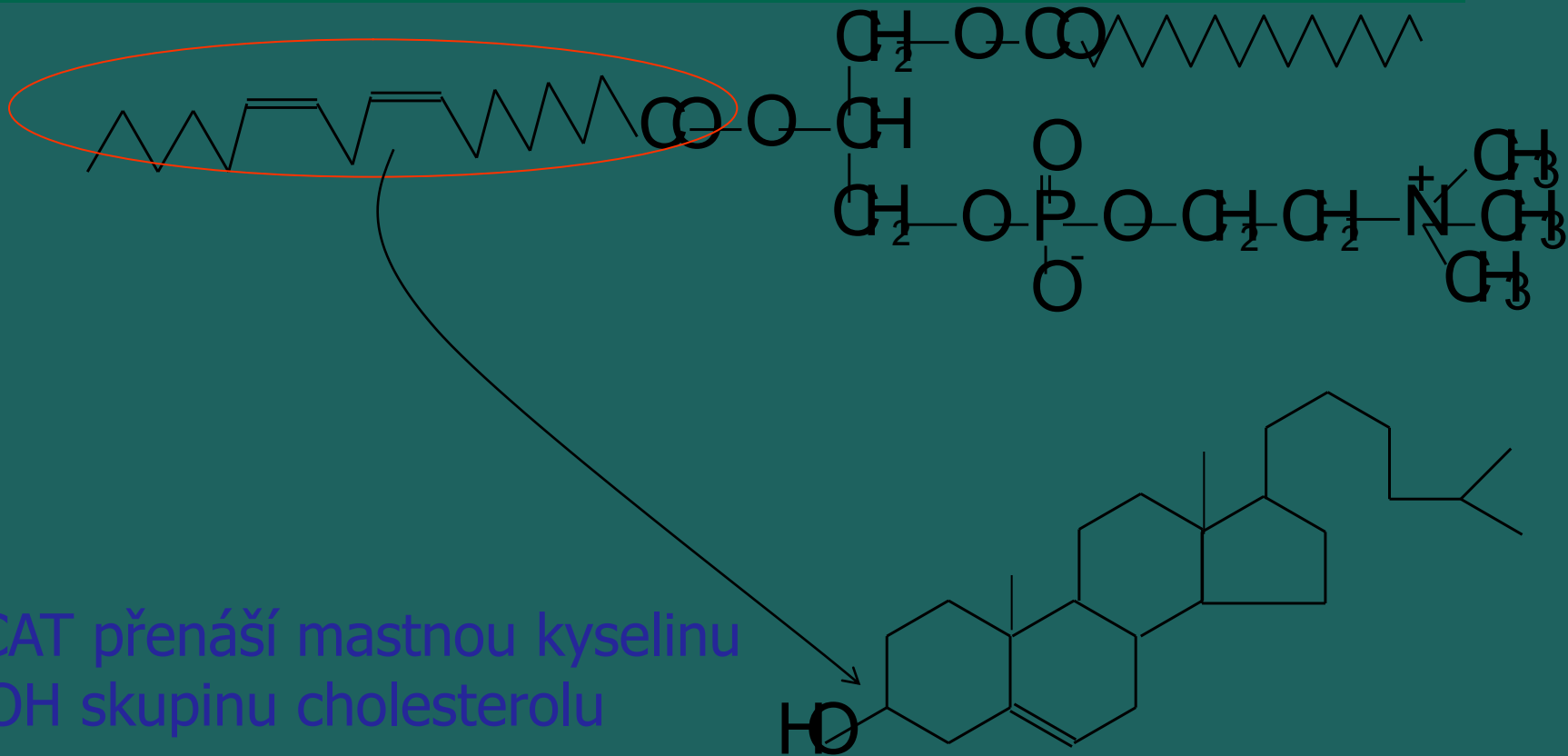
- IDL i LDL částice mohou být obohacovány estery cholesterolu z HDL
- IDL částice jsou vychytávány játry pomocí Apo-E receptoru
- **LDL jsou vychytávány periferními tkáněmi a játry receptorově zprostředkovanou endocytozou (Apo-B 100)**

# HDL

- vznikají v hepatocytech\_ (částečně i v enterocytech)
- HDL přijímají cholesterol z periferních tkání a zprostředkují jeho transport do jater

jejich funkci je důležitý enzym LCAT  
lecitincholesterolacyltransferáza – esterifikace cholesterolu

# Funkce LCAT



- LCAT přenáší mastnou kyselinu na OH skupinu cholesterolu
- **Cholesterol se esterifikuje,** esterifikovaný cholesterol je méně polární a zanořuje se do nitra HDL

# Lp(a)

- Lipoprotein o nízké hustotě
- Kromě Apo B100 má navíc Apo(a)
- Apo(a) je podobný plasminogenu
- Polymorfismus (hustotní a délkový)
- **Koncentrace Lp(a) v krvi dána geneticky**



## • Syntéza apo(a)

– v játrech, v plazmě S-S vazba na apoB

## • Odbourávání

– LDL-receptor related protein, VLDL receptor, megalin/glycoprotein ... -> všechny mají *úlohu v patogenezi aterosklerózy*

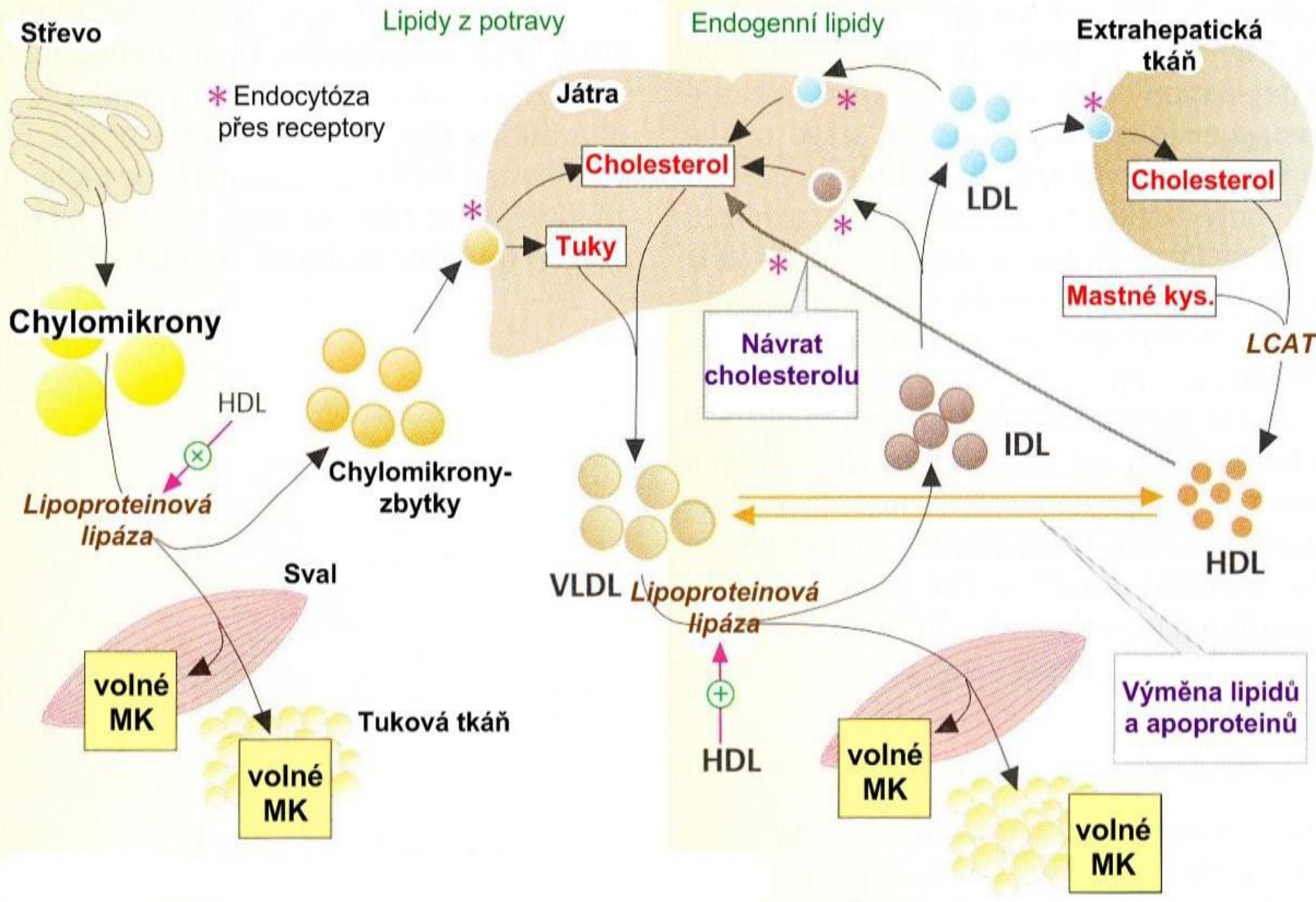
## • Ovlivnění (interindividuální rozdíly až 1000x)

– Genetické vlivy (apo(a) polymorfismy, rasa)

– Pozitivní reaktant akutní fáze (↑ infekce, nefrotický syndrom ...)

– Selhání jater (↓ ; ↓ produkce), ledvin (↑ ; ↓ vylučování)







# Jaké jsou doporučené metody?

Analyt	Referenční metoda	Certifikovaný referenční materiál
<b>Cholesterol</b>	ID-GC/MS ID-LC/MS	SRM 909b NIST; SRM 911b; NIST/SRM 1952a; SRM 1951b NIST
<b>Triacylglyceroly</b>	ID-GC/MS	SRM 909b NIST; NIST/SRM 1951a
<b>Cholesterol HDL</b>	UC a kvantifikace CDC	SRM 911a NIST; NIST/SRM 1951a
<b>Cholesterol LDL</b>	UC a kvantifikace CDC	SRM 911a NIST; NIST/SRM 1951a
<b>Apo AI</b>	Neexistuje	SP1-01 WHO
<b>Apo B</b>	Neexistuje	SP3-07 WHO
<b>Lp(a)</b>	Neexistuje	SRM 2B IFCC

# Odběr krve

- **pacient lačný 12-14h**
- 2-3 dny má být vynechán alkohol,
- krev odebrána bez dlouhé venostázy,
- pacient má dodržovat alespoň 2 týdny stávající životní styl

Diagnostické rozhodnutí o přítomnosti zvýšeného rizika je možné pouze na podkladě průměru dvou následných měření z dvou odběrů u jednoho pacienta, provedených v intervalu 1-8 týdnů, nejlépe v téže sérii měření.

# Odběr krve

**Tabule 5.** The necessity of fasting for lipid measurement depending on clinical condition (15)

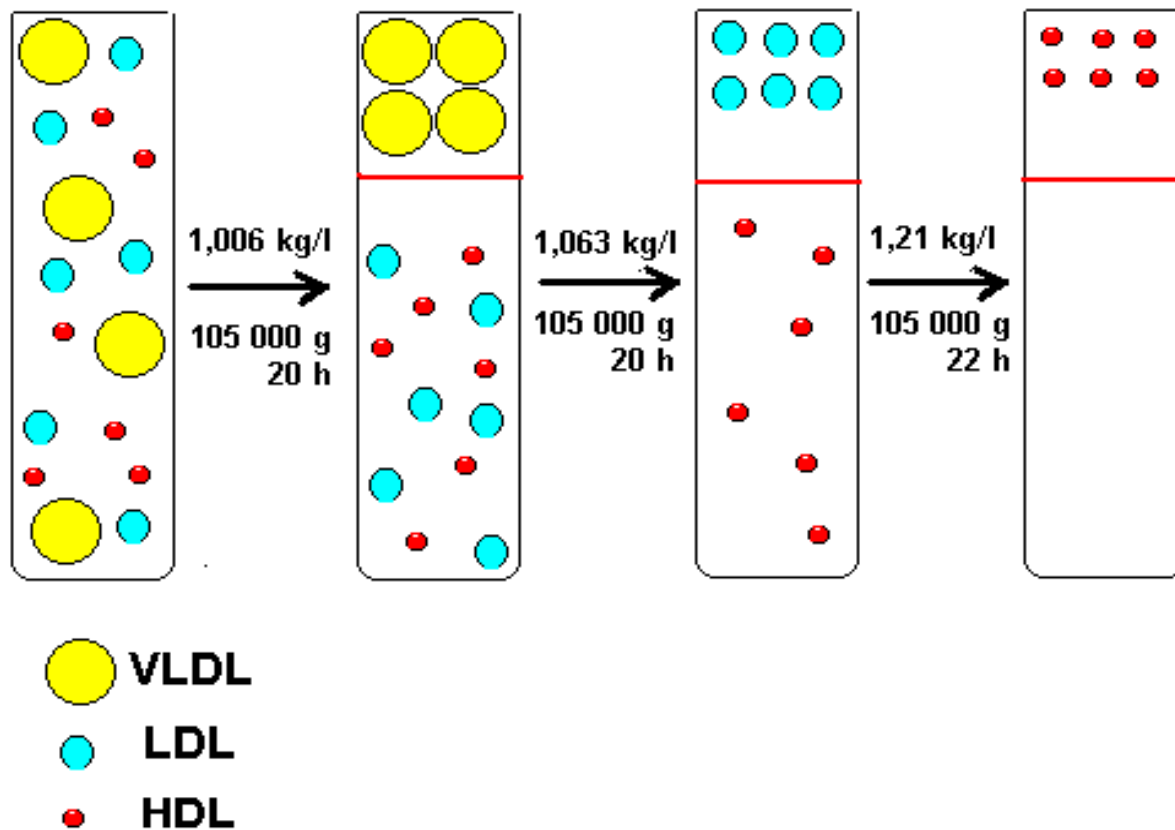
<b>Clinical condition</b>	<b>Necessity of fasting</b>
Estimating initial risk in an untreated patient in primary prevention	Non fasting acceptable
Screening and following patients with family history of genetic hyperlipidemia or premature atherosclerotic cardiovascular disease	Fasting required
Clarifying the diagnosis of metabolic syndrome*	Non-fasting acceptable*
Estimation residual risk for a treated patient	Fasting preferred
Assessing patients with or at risk for pancreatitis	Fasting preferred
Diagnosis of hypertriglyceridemia	Fasting preferred

\* Poznámka autorů tohoto komentáře: jedním ze základních kritérií metabolického syndromu je hodnota glykémie nalačno; odběr krve bez lačnění je tedy z tohoto pohledu nepoužitelný.

Zdroj: Společné stanovisko českých odborných společností ke konsensu European Atherosclerosis Society a European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine k vyšetřování krevních lipidů a k interpretaci jejich hodnot. Klin. Biochem. Metab., 24 (46), 2017, No. 1, p. 36

# Stanovení lipoproteinů

## 1) ULTRACENTRIFUGACE





## 2) ELEKTROFORÉZA

**Lipoproteinová  
částice**  
(densita: g/ml)

**ELFO**

**Zdroj**

**HDL**  
1,064-1,21

$\alpha$

*játra, střevo*  
*VLDL, chylo*

reverzní transport  
cholesterolu

**LDL**  
1,02-1,063

pre- $\beta$

*z IDL*

transport  
cholesterolu

**IDL**  
1,007-1,019

*z VLDL*

prekursor LDL

**VLDL**  
0,96-1,006

$\beta$

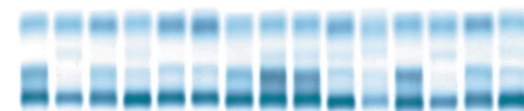
*játra*

transport  
endogenních  
triglyceridů

**chylomikra**  
< 0,95

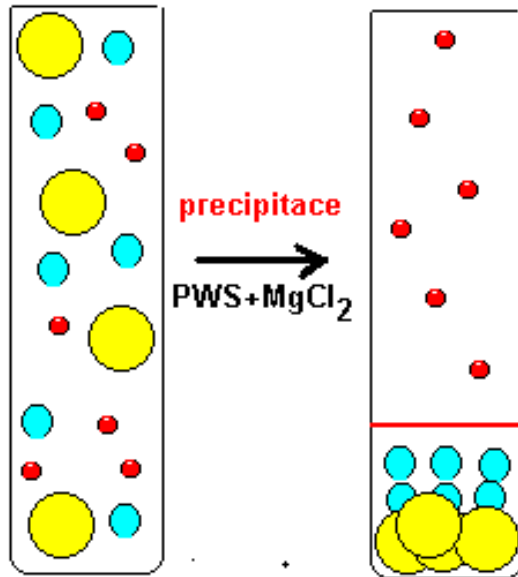
start *střevo*

transport  
exogenních  
triglyceridů



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

### 3) SELEKTIVNÍ PRECIPITACE



- VLDL
- LDL
- HDL

# Apolipoproteiny

- PROTEINOVÁ SLOŽKA LIPOPROTEINŮ

- FUNKCE:

AKTIVÁTORY A INHIBITORY ENZYMŮ

interakce s RECEPTORY

tvorba buněčných STRUKTUR

účast na přenosu nebo výměně lipidových částic





# Stanovení ApoAI a ApoB

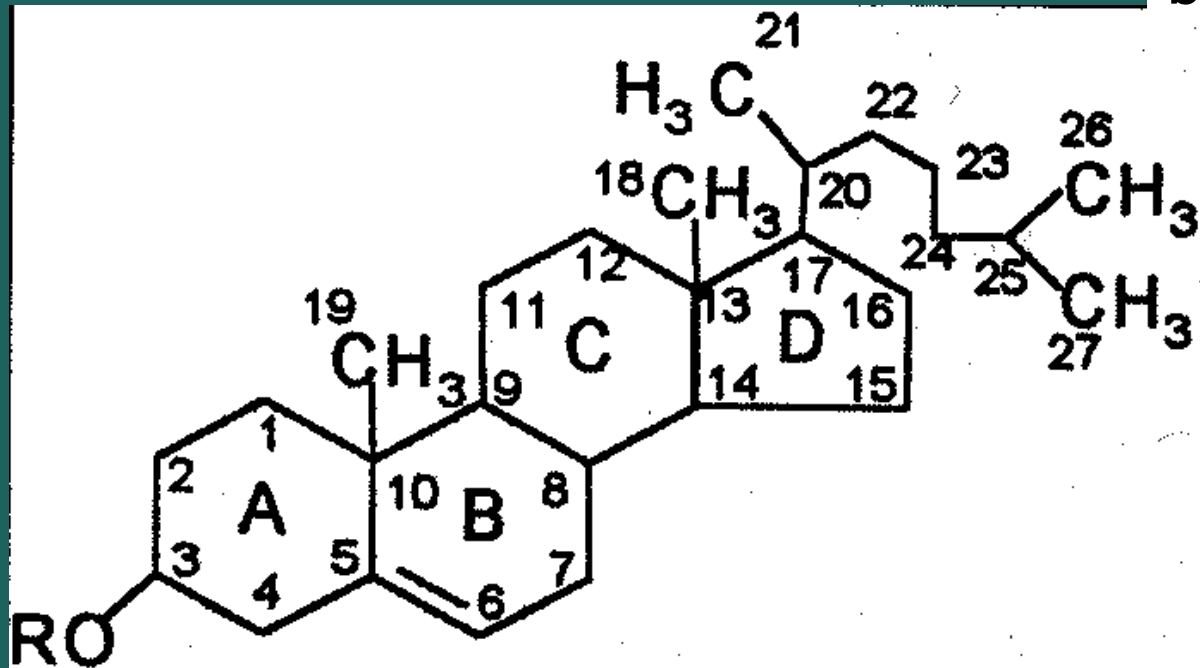
1) IMUNOTURBIDIMETRIE

2) IMUNONEFELOMETRIE

- Referenční metody nejsou definovány
- CRM: SP1-01 a SP3-07

# Cholesterol

bílá krystalická látka



R = H volný cholesterol ( 5-cholesten-3- $\beta$ -ol )

R = acyl (estery cholesterolu )

Cca  $\frac{3}{4}$  cholesterolu je nově syntetizováno,  $\frac{1}{4}$  pochází ze stravy





# Stanovení cholesterolu

## 1. Referenční metoda (ID-GC/MS)

- 1) **izotopová diluce** značeným vnitřním standardem
- 2) **separace** neznačeného a značeného analytu **plynovou chromatografií**
- 3) **detekce hmotnostní spektrometrií** po eluci z kolony

kalibrátor	NIST-SRM 911b
vnitřní standard	(3,4- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ) cholesterol
derivatizace	TMS(trimethylsilylether)
m/z analyt	458
m/z vnitřní standard	460
CV(průměr)	0,8%
bias	-0,5% (-1,4 až + 0,5%)

# Cholesterol

## 2. Enzymové stanovení

- Hydrolýza esterů cholesterolu  
(CHE, cholesterolesterasa)
- Oxidace cholesterolu  
(CHOD, cholesteroxidasa)
- Barevná reakce (oxidační kopulace)  
(POD, peroxidasa + chromogen, Trinderova reakce)

estery cholesterolu + H<sub>2</sub>O ↔ cholesterol + mastné kyseliny (CHE)

cholesterol + O<sub>2</sub> ↔ Δ<sup>4</sup>-cholesten-3-on + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (CHOD)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + chromogen ↔ H<sub>2</sub>O + barvivo (POD)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 4-aminoantipyrin + derivát fenolu ↔ chinoniminové barvivo + 4 H<sub>2</sub>O

# Stanovení HDL cholesterolu

## 1. Referenční metoda

Preparativní ULTRACENTRIFUGACE v hustotním gradientu

- 1) odstranění VLDL ze séra ultracentrifugací
- 2) odstranění IDL, LDL, a Lp(a) precipitací činidlem  $MnCl_2$ +heparin a centrifugací
- 3) stanovení cholesterolu v supernatantu referenční metodou Abell-Kendall (CDC metoda)

Klin.Biochem.Metab.,6(27)1998,1,50-56

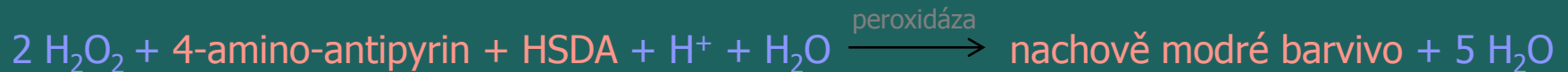
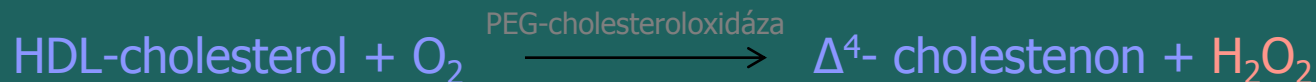
# HDL cholesterol

## 2. HOMOGENNÍ (přímé) metody

- a) Imunoseparace (Wako)  
(protilátky proti lidským  $\beta$ -lipoproteinům)
- b) Maskování (Daiichi)  
(polyanionové polymery)
- c) Modifikované enzymy a maskování (Kyowa)  
(enzymy modifikované PEGem + sulfáty cyklodextrinu)

# HDL cholesterol

- c) Modifikované enzymy a maskování (Kyowa)  
(enzymy modifikované PEGem + sulfáty  
cyklodextrinu)



\* HSDA = derivát anilinu [sodium N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimethoxyanilin]

# Stanovení LDL cholesterolu

## 1. Referenční metoda

Preparativní ULTRACENTRIFUGACE v hustotním gradientu

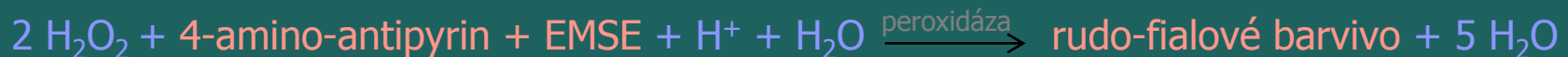
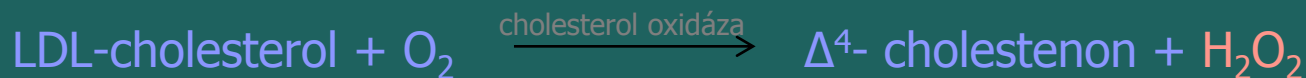
- 1) odstranění VLDL a chylomikronů ze séra ultracentrifugací (v supernatantu zůstane směs LDL+HDL o hustotě nad 1,006 kg/l)
- 2) stanovení cholesterolu v supernatantu (LDL+HDL) Abell-Kendallovou metodou (CDC)
- 3) odstranění LDL precipitací činidlem  $MnCl_2$ -heparin v druhé části supernatantu
- 4) stanovení cholesterolu po centrifugaci v supernatantu (HDL) Abell-Kendallovou metodou (CDC)
- 5) výpočet LDL cholesterolu podle vztahu:  
 $LDLChol = (LDL+HDL)Chol - HDLChol$

# LDL cholesterol

## 2. HOMOGENNÍ (přímé) metody

### a) metody s maskováním non-LDL částic

- Selektivní rozpuštění LDL-cholesterolu v micelách neionogenním detergentem
- Interakce cukerné složky s lipoproteiny (VLDL a chylomikrony) - maskování
- oddělení HDL od LDL selektivním detergentem
- stanovení cholesterolu v LDL, (reakce enzymů na lipoproteiny jiné než LDL jsou inhibovány surfaktanty a cukernou složkou)
- detekce peroxidu vodíku za tvorby zbarvení



\* EMSE = derivát diaminu [N-etyl-N-(3-metylfenyl)-N-succinyletylenediamin]







# Triacylglyceroly

Triacylglyceroly = estery glycerolu

Problémy při stanovení:

volný glycerol

diacylglyceroly

monoacylglyceroly

Odběr krve musí být nalačno (12 až 14h)

# Stanovení triacylglycerolů

## 1. Referenční metoda (ID-GC/MS)

- 1) izotopová diluce značeným vnitřním standardem
- 2) separace neznačeného a značeného analytu plynovou chromatografií

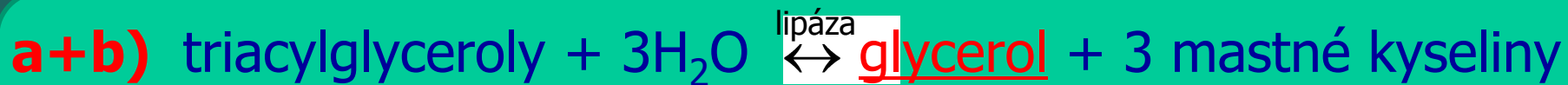
### 3) detekce hmotnostní spektrometrií po eluci z kolony

kalibrátor	NIST-SRM 1595 tripalmitin
vnitřní standard	( <sup>13</sup> C <sub>3</sub> ) tripalmitin
derivatizace	N-ethyl-N-trimethylsilylfluoroacetamid)
m/z analyt	215 hlavní měření 185,231(konfirmační měření)
m/z vnitřní standard	218-187,234(konfirmační měření)
CV(průměr)	0,57% nativní sérum-0,72% lyof. sérum
bias(diference od SRM 909)	0,10-0,25% lyofilizované sérum 0,14-0,45% nativní sérum

# Triacylglyceroly

## 2. Enzymové stanovení

- Hydrolýza (vznik glycerolu)
- Fosforylace (vznik glycerol-3-fosfátu)
  - a) Oxidace glycerol-3-fosfátu  
barevná reakce
  - b) Stanovení ADP  
stanovení pyruvátu (optický test)



**a)**

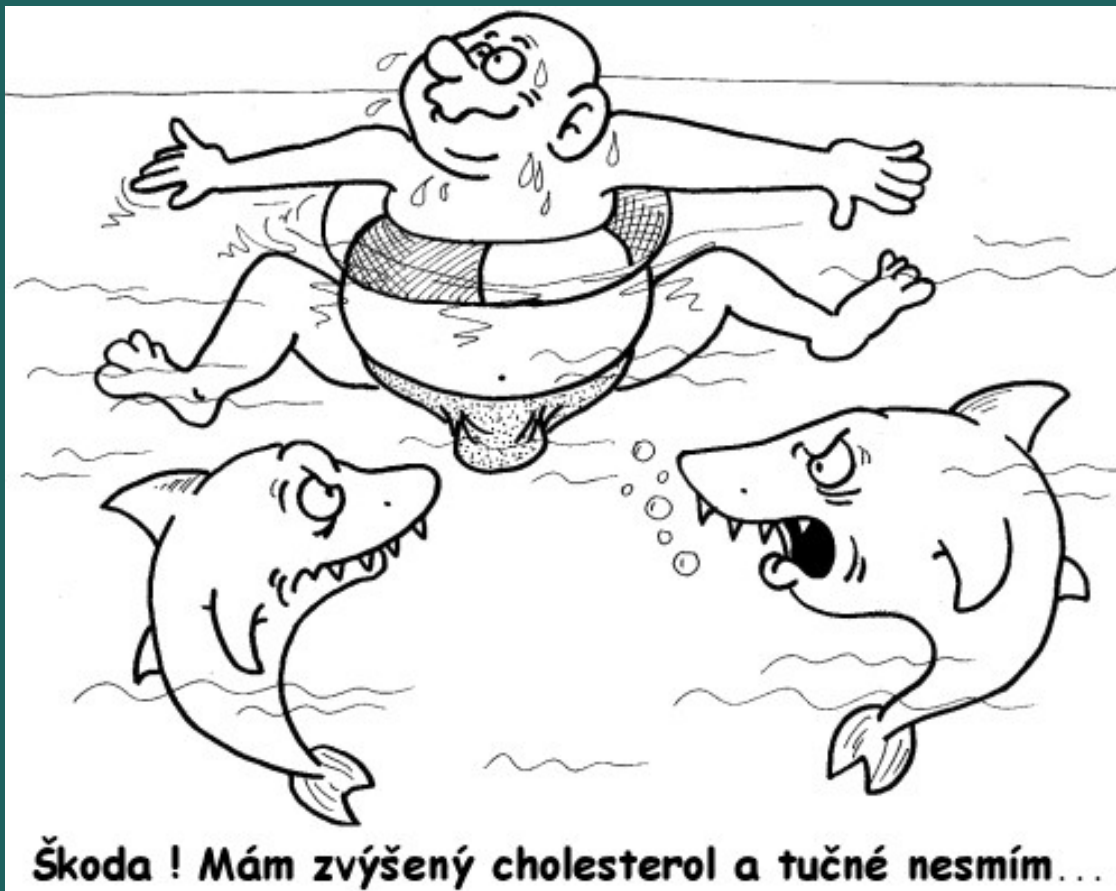


**b)**



# Doporučené hodnotící meze

Analyt	Muži		Ženy	
	Minimální	Maximální	Minimální	Maximální
Cholesterol (mmol/l)	2,90	<b>5,00</b>	2,90	<b>5,00</b>
LDL cholesterol (mmol/l)	1,20	<b>3,00</b>	1,20	<b>3,00</b>
HDL cholesterol (mmol/l)	<b>1,00</b>	2,10	<b>1,20</b>	2,70
Apo A1 (g/l)*	<b>1,00</b>	1,70	<b>1,10</b>	1,90
Apo B (g/l)*	0,50	<b>1,00</b>	0,50	<b>1,00</b>



Škoda ! Mám zvýšený cholesterol a tučné nesmím...

**Děkuji Vám za pozornost**

