

## Kapitola 14 Lipidy

Do skupiny *lipidů* patří látky poměrně různorodého složení. Z uvedené tabulky zjistíme, že většina z nich jsou *estery mastných kyselin s glycerolem* (glycerolipidy), *sfginosinem* (sfingolipidy), *cholesterolem* (estery cholesterolu) či *vyššími alkoholy* (vosky). Často obsahují různé *cukry* (glykolipidy), *kyselinu fosforečnou* (fosfolipidy), případně *další složky*, jako jsou *etanolamin* (fosfatidyletanolaminy), *cholin* (fosfatidylcholin), *serin* (fosfatidylseriny), *kyselina sírová* (sulfamidy), *étery* (plasmalogeny) aj. Společnou vlastností lipidů je jejich relativní nerozpustnost ve vodě a dobrá rozpustnost v tzv. *tukových rozpouštědlech*, tj. v nepolárních rozpouštědlech typu éteru, benzenu, chloroformu.

Lipidy								
Stavební složky nebo produkty metabolismu u lipidů	Isoprenoidní lipidy	Složité lipidy				Neutrální tuky		Vosky
		Estery mastných kyselin						
		Sfingolipidy		Glycerolipidy				
		Glykolipidy	Fosfolipidy					
Uhlovodíky	Steroidy	Estery cholesterolu	Cerebrosidy	Sfingomyeliny	Fosfatidylcholin	Monoacylglyceroly	Diolové lipidy	Metyl a etyl estery vyšších alkoholů s vyššími mastnými kyselinami
Vyšší alkoholy	Karotenoidy		Sulfatidy		Fosfatidyletanolaminy	Diacylglyceroly		
Vyšší aldehydy			Ceramidoligosacharidy		Fosfatidylseriny	Triacylglyceroly		
Mastné kyseliny			Gangliosidy		Fosfatidylinositoly			
Prostaglandiny					Fosfatidylglyceroly			
					Estery glyceryl-eterů (plasmalogeny)			

**Vysvětlivky k tabulce:**

- Isoprenoidní – základem této skupiny lipidů je isopren (jako výchozí složka syntézy)
- Glyko- v lipidech je obsažena glycidová složka
- Fosfo- v lipidech je obsažen fosforečnan (fosfát)
- Sfingo- v lipidech je obsažen alkohol sfingosin
- Glycero- v lipidech je obsažen alkohol glycerol

Tělesné lipidy pocházejí z *tuků v potravě*, které byly stráveny, vstřebány ve střevě a chemicky pozměněny a z *vlastní biosyntézy* ze sacharidů a z proteinů.

**Význam lipidů je široký:**

- triacylglyceroly
  - jsou významným (primárním) *zdrojem* energie
  - představují hlavní *zásobu* energie
- fosfolipidy a cholesterol se vyskytují ve značném množství v membránách buněk a buněčných organel (strukturní lipidy)
- cholesterol je navíc prekursorem steroidních hormonů
- lipidy
  - mají izolační vlastnosti (ochrana orgánů před mechanickým šokem, tepelná izolace)
  - usnadňují tok elektronů podél nervových drah

*Změny ve spektru plazmatických lipidů*, ať jsou změnami *primárními* (na genetickém podkladu), či *sekundárními* (způsobené chorobami, nezdravým životním stylem či jinými činiteli), znamenají vždy pro jejich nositele větší či menší riziko onemocnění vážnými chorobami, často s fatálními důsledky. Míněny jsou zejména ateroskleróza, ischemická choroba srdeční a infarkt myokardu. Účast jednotlivých lipidů, především lipoproteinů, na tomto riziku, bude u jednotlivých zástupců stručně zmíněna jako tzv. *aterogenita*. Místo obvyklých „referenčních mezí“ jsou uváděny „hodnotící meze“, což jsou hodnoty, které se sice v průměru u populace asi nenacházejí, ale nacházet by se měly, má-li být daná populace zdravá.

Hodnotící meze jsou kombinací mezí referenčních a hodnot optimálních, získaných z doporučení pro prevenci a léčbu kardiovaskulárních chorob. Nicméně odborné názory na tuto stránku problému se v posledních letech prudce mění.

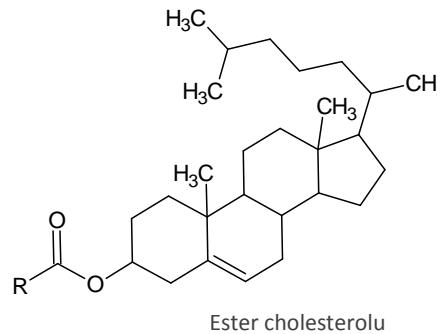
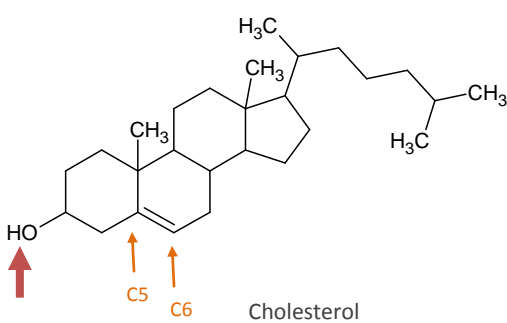
**K podrobnějšímu vysvětlení pojmu** „hodnotící meze“ viz [Doporučení ČSKB](#) na (WEB) stránkách ČSKB.

Diagnóza, terapie a monitorování těchto chorob se do značné míry opírá o laboratorní nálezy, proto je pro laboratorní pracovníky vhodné, aby se seznámili se základní chemií lipidů, s principy jejich metabolismu a s metodami jejich laboratorního stanovení. Něco z těchto požadavků již splnila obecná biochemie a některé další podrobnosti jsou, alespoň ve stručnosti, uvedeny v dalším textu.

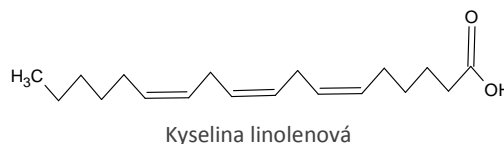
Z klinicko-biochemického hlediska mají význam především *mastné kyseliny*, *triacylglyceroly (triglyceridy)*, *cholesterol*, *fosfolipidy (fosfatidy)* a *sfgingolipidy*, z hlediska rutinní klinicko-biochemické praxe pak *triacylglyceroly* a *cholesterol* ve všech formách. Nauka o lipidech je poněkud komplikovaná, takže tato kapitola má svou specifickou skladbu. V úvodu budou nejprve stručně probrány základní vlastnosti cholesterolu a triacylglycerolů a metody jejich stanovení. Dále bude zmínka o mastných kyselinách a fosfolipidech. Následně budou probrány apoproteiny, jejich vlastnosti a metody stanovení a nakonec lipoproteiny, jejich vlastnosti, původ, metabolismus a metody stanovení. Přehled o celé látce si může student udělat pomocí závěrečného stručného shrnutí na konci kapitoly.

### 14.1. Cholesterol je živočišný sterol

Cholesterol je živočišný sterol s 27 uhlíky, jednou dvojnou vazbou a jednou alkoholickou skupinou .

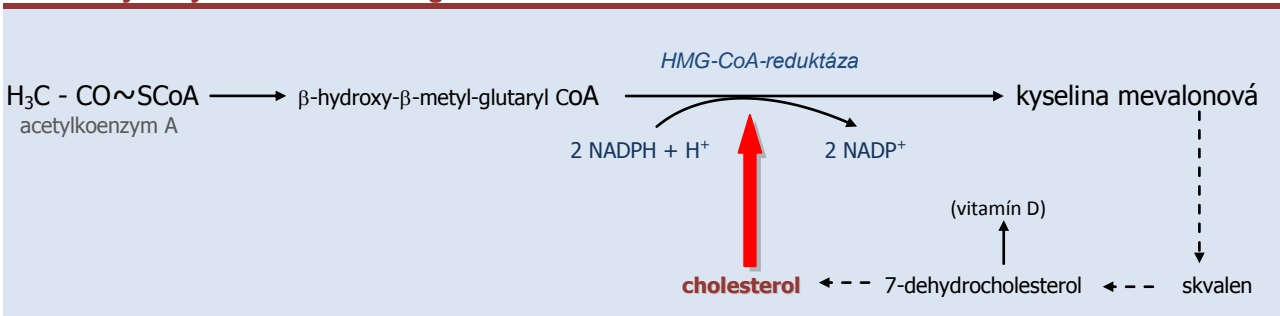


RCOOH = mastná kyselina, nejčastěji kyselina linolová nebo linolenová:



Cholesterol se vyskytuje prakticky v každé tělesné buňce, zvláště hojný je v nervové tkáni, pro mozek je naprosto nezbytný. Syntézy je schopna každá živočišná buňka, probíhá však zejména v hepatocytech, v enterocytech a v nervové tkáni.

#### Náznak syntézy cholesterolu v organismu



<sup>\*)</sup> **HMG-CoA-reduktáza** =  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methyl-glutaryl-CoA-reduktáza, resp. 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA-reduktáza, klíčový enzym v metabolismu cholesterolu – plná šipka naznačuje regulaci zpětnou vazbou (cholesterol, produkt, ale i exogenní cholesterol, potlačuje tvorbu enzymu); enzym má poločas několik hodin a jeho nízká hladina znamená nízkou syntézu cholesterolu a opačně; schopnost syntézy tohoto enzymu mají zřejmě všechny buňky. Aktivita tohoto enzymu je zvýšena také při vysokoenergetické dietě a u obezity. Čárkované šipky naznačují, že metabolická cesta obsahuje ještě další meziprodukty (cesta není znázorněna úplně).

Syntéza v jiných tkáních probíhá při jeho nedostatku. Začíná postupnou kondenzací tří molekul acetylkoenzymu A („aktivované kyseliny octové“) na další makroergickou sloučeninu,  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylglutarylCoA. Z této látky, za přispění enzymu HMG-CoA-reduktázy<sup>1)</sup>, vzniká kyselina mevalonová, klíčová látka pro syntézu izoprenoidů (mezi které cholesterol patří). Zmíněný enzym je alostericky ovlivňován cholesterolem, takže při jeho nadbytku je syntéza cholesterolu utlumena. Naopak, při nedostatku cholesterolu je enzym aktivní a syntéza cholesterolu probíhá. Aktivita enzymu je zvýšená také při vysokoenergetické dietě a u obezity.

Systematický název cholesterolu je *3-hydroxy-5,6-cholesten*. Je typickým produktem živočišného metabolismu a prekurzorem všech ostatních steroidů v těle (kortikoidů, pohlavních hormonů, žlučových kyselin a vitamínu - hormonu D). Je nezbytný pro syntézu všech lipoproteinů ve střevě a játrech. Umožňuje resorpci triacylglycerolů a v tučných rozpustných vitamínů ze střeva. Jako *amfipatický* lipid, (má hydrofobní i hydrofilní vlastnosti) je významnou složkou membrán a vnější vrstvy plazmatických lipoproteinů. Nachází se také v živočišných tučích, ne však v rostlinných. Vyskytuje se volný a esterifikovaný mastnými kyselinami (esterifikována je OH- skupina, označená ve vzorci na předchozí straně červenou šipkou), nejčastěji kyselinou linolovou nebo linolenovou. Esterifikovaný cholesterol je zásobní formou cholesterolu ve většině tkání, především v hepatocytech. V transportní formě lipidů, *lipoproteinech*, tvoří estery cholesterolu, jakožto nepolární lipidy, jádro lipoproteinu, částečně polární volný cholesterol je v obalu lipoproteinu.

Z organismu se cholesterol vylučuje žlučí ve formě žlučových kyselin, resp. solí žlučových kyselin (*žlučové soli*, viz také Kapitola 12, [str.](#) 12-30), a také jako cholesterol, který se ovšem ve střevě mění činností bakterií na koprosterol (bakteriální redukce dvojně vazby mezi uhlíky C5 a C6).

#### 14.1.1. Metody stanovení cholesterolu

**Původní neenzymové metody** používaly agresivní reagenty (koncentrované kyseliny), nebyly příliš specifické a nehodily se k automatizaci. Byly nahrazeny moderními, specifickými, enzymovými metodami, vyvinutými zejména pro využití v automatických analyzátoch.

##### Neenzymové metody stanovení cholesterolu a jejich principy

- **Liebermannova-Buchardova reakce:** Cholesterol, kyselina sírová a anhydrid kyseliny octové spolu reagují za vzniku **zeleného zbarvení**.
- **Zlatkissova reakce:** Cholesterol, kyselina sírová, ledová kyselina octová a  $\text{Fe}^{3+}$  poskytují **červené zbarvení**.

Bilirubin a hemoglobin v obou případech falešně zvyšují výsledky stanovení cholesterolu. Obě metody se používaly v různých modifikacích, dnes jsou v rutinní praxi opuštěny a nahrazeny specifickými enzymovými metodami; reakce podle *Liebermanna-Bucharda* však tvoří součást referenční metody.

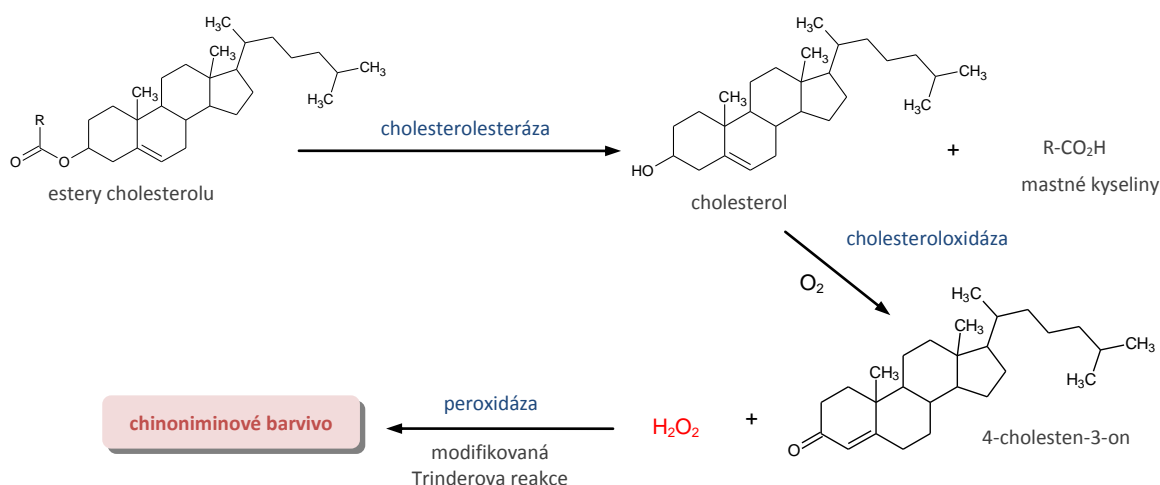
**Bývalá diagnostická souprava PLIVA-Lachema Diagnostika: Cholesterol (CHOL 150):** Modifikace podle Liebermanna a Burcharda, kromě kyseliny sírové a anhydridu kyseliny octové (= acetanhydridu) vstupuje do reakce navíc 2,5-dimethylbenzensulfonová kyselina, která potlačuje interferenci bílkovin. Zelené zbarvení je fotometrováno při 560 – 590 nm. Reakce probíhá asi 15 min, teplota se má pohybovat mezi 10 – 20 °C (nutné chlazení!), zbarvení je stálé 45 min. Interferuje bilirubin, hemoglobin (hemolýza vadí!) výsledek je závislý i na kvalitě chlazení. Referenční hodnoty pro tuto metodu uváděl výrobce v rozmezí 4,65 – 6,46 mmol cholesterolu/l (pro obě pohlaví) – viz poznámky dál.

##### Referenční metoda pro stanovení celkového cholesterolu podle *Abella-Kendalla/Leveye-Brodieho*:

Po extrakci cholesterolu a esterů cholesterolu ze séra se estery cholesterolu zhydrolyzují a barevnou Liebermann-Buchardovou reakcí se stanoví celkový cholesterol. Tímto postupem dojde ke stejnému vybarvení obou složek (estery mají jinou výtěžnost v reakci s činidlem než volný cholesterol) a k odstranění interferencí.

### Princip enzymových metod stanovení cholesterolu

V prvním kroku štěpí cholesterolesteráza estery cholesterolu na cholesterol a mastné kyseliny. V dalším kroku je cholesterol za přispění cholesteroxidázy oxidován kyslíkem na cholestenon a peroxid vodíku. Peroxid vodíku se stanoví modifikovanou *Trinderovou reakcí*.



### Hodnoticí meze pro sérový celkový cholesterol:

Dolní mez: 2,90 mmol/l Horní mez: 5,00 mmol/l

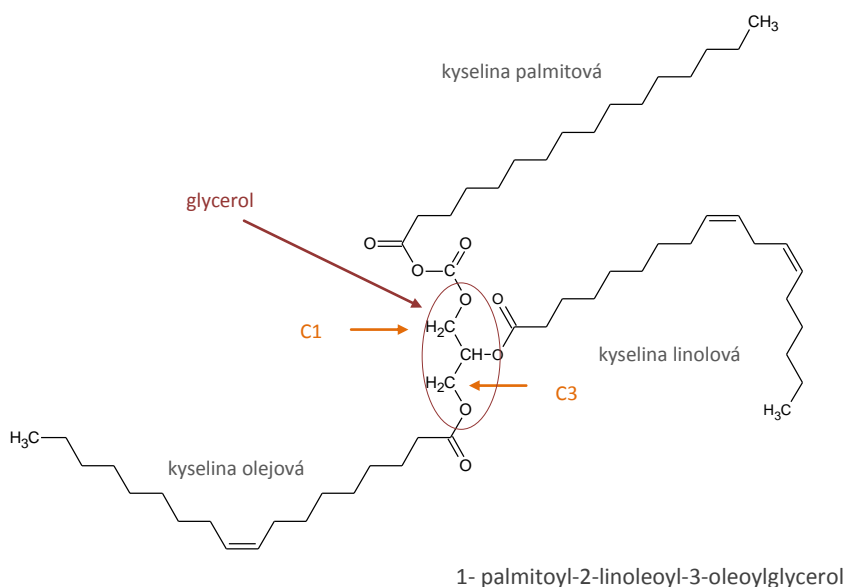
**Poznámka:** současné poznatky nasvědčují tomu, že nedostatek cholesterolu vede k poškození mozku a kognitivních funkcí.

**Příklady diagnostických souprav ERBA Lachema :** Cholesterol Liquid 250 (CHOL L 250), Cholesterol Liquid 1000 (CHOL L1000); Soupravy obsahující CHOD (cholesteroxidázu) a POD (peroxidázu), s kapalnými reagensy (liquid = kapalný, kapalina); výsledné růžové zbarvení se fotometruje při 500 nm resp. při 546 nm. Podobné soupravy vyrábí řada dalších firem.

## 14.2. Triacylglyceroly jsou estery glycerolu a mastných kyselin

Triacylglyceroly (triglyceridy) jsou estery trojsytného alkoholu glycerolu a mastných kyselin. Většina přírodních tuků jsou *smíšené acylglyceroly*, tzn., že mají v esterových pozicích různé mastné kyseliny. Nejčastěji bývají na prvním uhlíku kyselina palmitová, na druhém linolová a na třetím kyselina olejová.

### Příklad typického triacylglycerolu



Z hlediska stereochemie nejsou uhlíky C1 a C3 identické, enzymy je snadno rozlišují a jsou téměř vždy specifické pro některý z těchto uhlíků. Poslední uhlík ve vzorci mastné kyseliny bývá označován  $\omega$  (omega). Během metabolismu se uvolňují i částečné acylglyceroly, tj. monoacylglyceroly či diacylglyceroly. Triacylglyceroly jsou hlavní zásobní formou mastných kyselin, které jsou zase zásobní formou dostupné energie pro buňky.

Triacylglyceroly získává organismus z potravy (exogenní triacylglyceroly), a také si je sám syntetizuje z mastných kyselin a glycerolu (endogenní triacylglyceroly). Syntéza triacylglycerolů probíhá v játrech a v enterocytech. Při trávení se tuky rozštěpí na mastné kyseliny a monoacylglyceroly a pasivně vstupují do enterocytů. Mastné kyseliny s krátkým řetězcem se vstřebávají přímo do portální krve (jsou poměrně dobře rozpustné ve vodě) a putují do jater. Monoacylglyceroly a mastné kyseliny s dlouhým řetězcem, které jsou nerozpustné ve vodě, jsou v enterocytech sliznice tenkého střeva resyntetizovány na triacylglyceroly a zabudovány do jádra chylomikronů, transportní formy (externě přijatých) lipidů nerozpustných ve vodě. Podobným způsobem jsou zpracovány také estery cholesterolu a vitamíny rozpustné v tucích.

Hlavní zásobárnou triacylglycerolů v těle je tuková tkáň. Tato tkáň je aktivní, dochází zde neustále k rozkladu a syntéze, k lipolýze a esterifikaci, což jsou dva rozdílné děje, s různými reaktanty a enzymy. Nejedná se o jednu zvrtně probíhající reakci. Výsledkem obou dějů je hladina volných mastných kyselin v krevní plazmě, která dále ovlivňuje metabolismus jiných tkání, např. jater a svalů. V metabolismu tukové tkáně se uplatňuje řada hormonů, zejména insulin, který inhibuje lipolýzu, konkrétně inhibuje *hormon-senzitivní lipázu*, která je aktivní pouze při nízkých koncentracích inzulínu (např. při hladovění). Naopak glukokortikoidy a hormony štítné žlázy lipolýzu podporují. Dalšími hormony jsou *adiponektin* a *leptin*, peptidové hormony, které jsou předmětem značného zájmu výzkumníků z oblasti lipidového metabolismu a nutriční. Oba se tvoří v adipocytech (tukových buňkách) a patří tak mezi tzv. *adipokiny*, tj. látky tvořené tukovými buňkami. Leptin působí na hypotalamus a zřejmě reaguje především na energetický deficit organismu. Popsán byl v roce 1994. Adiponektin byl objeven v polovině 90. let minulého století a jeho funkce je zejména ochranná (potlačení produkce kyslíkových radikálů, snižování hladiny adhesivních molekul, stimulace protizánětlivých interleukinů aj.).

Metabolismus tukové tkáně a faktory, které jej ovlivňují, mají značný význam pro celý organismus. Tukovou tkáň lze považovat za samostatný endokrinní orgán, jehož buňky (*adipocyty*), produkují řadu hormonálně aktivních látek, které ovlivňují nutriční stav jedince.

Triacylglyceroly jsou vývojově primárním zdrojem energie, slouží také jako energetická zásoba pro organismus, podkožní tuk pak jako tepelná izolační vrstva.

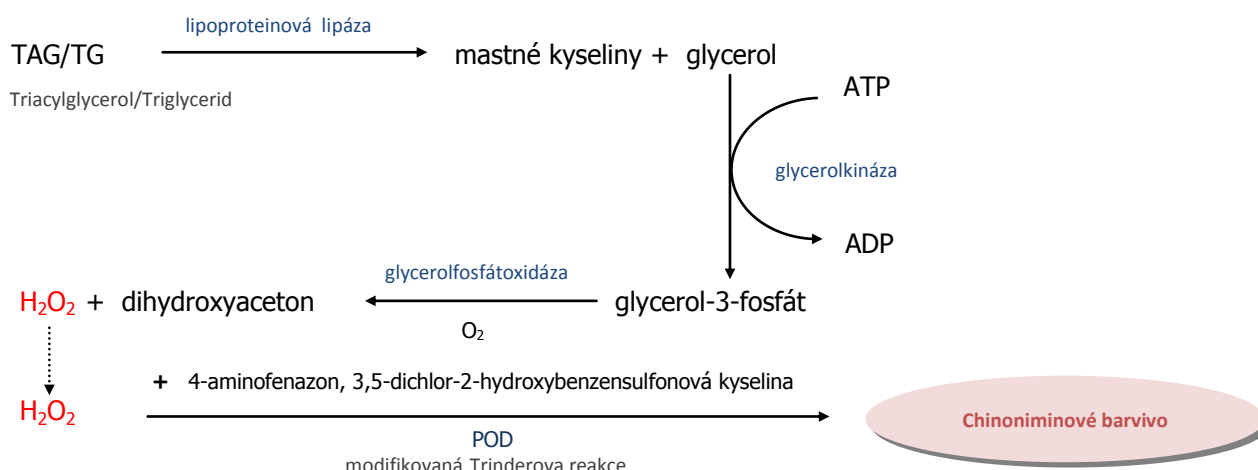
### 14.2.1. Metody stanovení triacylglycerolů

Klasické metody stanovení triacylglycerolů byly poněkud komplikované, nespecifické, v automatických analyzátoch nepoužitelné. V současné denní laboratorní praxi byly nahrazeny metodami využívajícími enzymy. Enzymové metody jsou specifické, relativně jednoduché a nastavené pro použití v automatických analyzátoch.

#### Extrakční metoda

**Pro zvědavé studenty** – princip extrakční metody (neenzymová metoda pro stanovení triacylglycerolů)

	Obecný postup	Souprava PLIVA-Lachema Diagnostika Triglyceridy 50
1.	Extrakce lipidů	Extrakce lipidů izopropanolem
2.	Odstranění fosfolipidů adsorpcí na adsorbent	Adsorpce fosfolipidů na oxid hlinitý (?), třepání na třepačce po dobu 10 – 15 min, centrifugace
3.	Zmýdelnění triacylglycerolů	Zahříváním při 60 °C s KOH po dobu 5 – 10 min
4.	Vysrážení nebo vyvázání mastných kyselin	Tvorba esterů s izopropanolem
5.	Oxidace (zbylého) glycerolu jodistanem na formaldehyd	Oxidační činidlo, 10 min při laboratorní teplotě
6.	Stanovení formaldehydu barevnou reakcí	Reakce formaldehydu s acetylacetonem za přítomnosti amonných iontů na světle žlutý 3,5-diacetyl-1,4-dihydrolutidin ( <i>viz stanovení kyseliny močové</i> ), při 60 °C po dobu 30 minut; následuje fotometrie při 405 - 420 nm

**Enzymové metody****Princip enzymových metod****Pro zvědavé studenty:**

V případě vzácného onemocnění s defektem glycerolkinázy charakterizovaného vysokou glycerolémií budou výsledky stanovení triacylglycerolů vysoké, chylolizata séra však nebude odpovídat nalezeným hodnotám. Reakce glycerol  $\rightarrow$  glycerol-3-fosfát probíhá i v organismu. U zmíněné poruchy je přeměna na fosforylovaný glycerol nedostatečná (je defektní enzym glycerolkináza), glycerol zůstává v séru, jeho hladina již není zanedbatelná a (falešně) navyšuje výsledek.

**Dg soupravy Erba-Lachema, s.r.o.:** Triacylglyceroly Liquid 250 S (TG L 250 S), Triacylglyceroly Liquid 1000 (TG L 1000): metody s glycerolfosfátoxidázou a POD s kapalnými reagensii (liquid = kapalina, kapalný); fotometrie při 500, resp. při 546 nm.

**Hodnoticí meze pro sérové triacylglyceroly:** Dolní mez: 0,45 mmol/l Horní mez: 1,70 mmol/l

**14.3. Volné mastné kyseliny**

Mastné kyseliny jsou karboxylové kyseliny s dlouhými řetězci, nasycené i nenasycené. Pro organismus představují jeden ze základních energetických zdrojů (základní energetický zdroj pro srdeční a kosterní svalstvo). Jsou syntetizovány z dvouuhlíkatých štěpů, jejichž zdrojem je především glukóza. Hlavním místem syntézy je jaterní tkáň. V krvi jsou přepravovány ve vazbě na albumin, kdy jedna molekula albuminu může nést až 20 molekul mastných kyselin. Nevyužité mastné kyseliny jsou v játrech znovu zpracovány na triacylglyceroly a v této formě uloženy jako zásobní zdroj energie.

Mastné kyseliny s dvojnými vazbami jsou, mimo jiné, prekurzory prostaglandinů a tvoří součást buněčných membrán. Ačkoliv jsou pro organismus důležité, ne všechny si je dokáže vytvořit a musí být přijímány potravou. Jsou pro organismus **esenciální** (Essential Fatty Acid, EFA).

**Esenciální:** z latinského *essentia, podstata věci* = hlavní, důležitý, podstatný, základní, životně důležitý.

V uvedeném kontextu (a podobných kontextech) znamená sloučeninu, která je pro organismus nezbytná, ale organismus ji musí přijímat zvenčí, nedokáže si ji sám vytvořit (esenciální aminokyseliny, esenciální mastné kyseliny).

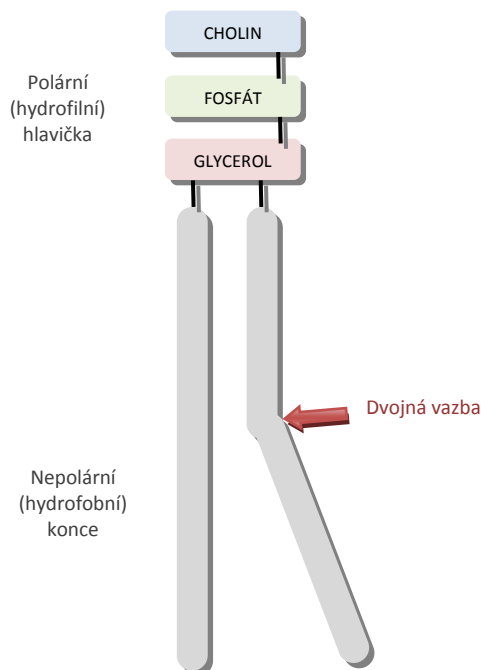
**Referenční hodnoty:** V krvi se nachází mezi 0.30 – 1,10 mmol/l volných mastných kyselin.

**Poznámka:** Mastné kyseliny mají velmi krátký biologický poločas a již během první minuty je zmetabolizována asi jedna třetina množství, které vstoupilo do krve. Hladina v krvi je také značně závislá na fyzické aktivitě (cvičení, fyzické práci), na hladině krevní glukózy a na všech okolnostech, které mají za následek uvolnění adrenalinu.

Mastná kyselina	Počet uhlíků/počet dvojných vazeb	Syntéza v organismu
Palmitová	16/0	+
Stearová	18/0	+
Myristová	14/0	+
Palmitoolejová	16/1	+
Olejová	18/1	+
Linolová	18/2	-
Arachidonová	20/4	-
Linolenová	18/3	-
Eicosapentaenová	20/5	-
Docosahexaenová	22/6	-

#### 14.4. Fosfolipidy jsou estery mastných kyselin se sfingosinem nebo s glycerolem

Fosfolipidy jsou estery mastných kyselin s alkoholem, kterým může být buď sfingosin (sfingomyeliny) nebo glycerol. Podle obsahu dalších látek v esterech s glycerolem pak rozeznáváme dále např. fosfatidylcholin, fosfatidyletanolaminy, fosfatidylseriny, fosfatidyl-inositoly a další.



Na obrázku vlevo je schematicky znázorněna molekula fosfatidylcholinu (lecitinu) s hydrofilní „hlavičkou“ a hydrofobním „koncem“. Tento charakter molekuly umožňuje látkám tohoto typu inkorporaci do buněčné membrány, lipoproteinu apod., kdy hydrofilní část je orientována do vodného prostředí a hydrofobní část je orientována do prostředí lipidového.

Znázorněný fosfatidylcholin patří mezi nejčastěji se vyskytující fosfolipidy.

Ačkoliv jsou z hlediska biologického fosfolipidy nesmírně důležité, z praktického hlediska laboratorní medicíny ve vztahu k poruchám lipidového metabolismu nemají prakticky žádný význam a jejich koncentrace v krvi se neměří.

Fosfatidylcholin (lecitin); (Vzorec lecitinu je uveden v kapitole 15 na [str. 15-19](#))

#### 14.5. Všechny plazmatické lipidy se vážou na bílkoviny

Vazbou na bílkoviny se stanou lipidy rozpustnými ve vodném prostředí a mohou být transportovány v extracelulární tekutině.

**Polární lipidy** (neesterifikované mastné kyseliny, lyzolecitin) jsou transportovány albuminem, některé specifickým transportním proteinem (*retinol binding protein, RBP*,  $\alpha$ -globulin vázající retinol).

**Nepolární lipidy** (triacylglyceroly, estery cholesterolu) jsou transportovány makromolekulárními útvary, *lipoproteiny*, ve kterých jsou vázány na bílkoviny zvané *apoproteiny* (často se jim říká i *apolipoproteiny*).

Hlavní „dopravní“ prostředky lipidů v plazmě jsou pro	
Volné mastné kyseliny	Albumin
Triacylglyceroly exogenní (z potravy)	Chylomikrony
Triacylglyceroly endogenní (z vlastní syntézy)	VLDL
Cholesterol	Chylomikrony, VLDL, LDL, HDL

**Plazmatické lipoproteiny** se liší svou hustotou, relativním obsahem jednotlivých lipidů, typem bílkoviny (apoproteinu) a některými dalšími vlastnostmi. Dělení lipoproteinů do jednotlivých tříd vychází obvykle z rychlosti sedimentace při ultracentrifugaci v hustotním gradientu, ale je možné i na základě elektroforetické separace. Při elektroforetickém dělení se dosahuje vyššího počtu frakcí než při ultracentrifugaci, též názvosloví při tomto způsobu dělení je odlišné.

Ultracentrifugace rozdělí lipoproteiny do pěti skupin, pěti základních typů nebo tříd lipoproteinů, které se liší jak svým složením, tak biologickou funkcí. Z hlediska klinického se liší např. svou schopností zasahovat do procesu aterosklerózy (*aterogenitou*).

### Třídy lipoproteinů na základě dělení metodou ultracentrifugace

- **CL** (*Chylomikrony, Chylomikra*)
- **VLDL** (*Very Low Density Lipoproteins* = lipoproteiny o velmi nízké hustotě)
- **LDL** (*Low Density Lipoproteins* = lipoproteiny o nízké hustotě)
- **IDL** (*Intermediate Density Lipoproteins* = lipoproteiny o střední hustotě)
- **HDL** (*High Density Lipoproteins* = lipoproteiny o vysoké hustotě)

**Poznámka I:** ultracentrifugací lze rozlišit ještě CL remnants (remnantní čili zbytková/é chylomikra/chylomikrony)

**Poznámka II:** mezi hustotou a velikostí molekuly je vztah nepřímo úměrný – čím vyšší hustota, tím menší molekula a naopak

**Stavba lipoproteinů** má v podstatě ve všech třídách stejnou strukturu – v jádru se nacházejí nepolární lipidy (triacylglyceroly, estery cholesterolu) a jádro je obklopeno jednoduchou vrstvou polárních lipidů (fosfolipidy, volný cholesterol) a bílkovin, apolipoproteinů (viz obrázek vpravo; srovnajte též se schématem stavby chylomikronu na str. 11-12 a schématem stavby LDL na str.11-14)

Některé lipoproteiny jsou uspořádány ve dvojvrstvě, ve formě diskoidní (např. *nascenční HDL*) nebo vezikulární (váčkovité).

**Vlastnosti lipoproteinů** jsou převážně určeny jejich bílkovinnou částí, apoproteiny. Ty jsou složeny buď z jednotlivých polypeptidových řetězců, nebo z několika neidentických polypeptidů.

**Systém a nomenklatura** do problematiky apolipoproteinů zavedl v roce 1971 *Petar Alaupovic, Ph.D.*, vědec původem z Jugoslávie, dnes žijící v Oklahoma City, člen mnoha významných vědeckých institucí a nositel mnoha vědeckých ocenění.

#### Abecední nomenklatura třídí apoproteiny do skupin (rodin),

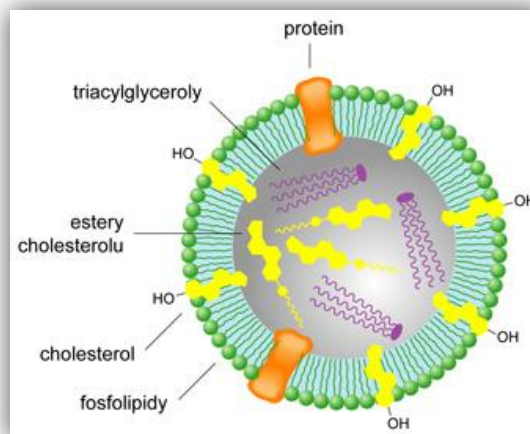
které se označují velkými písmeny abecedy: *A, B, C, D, E, F, G* (*apoA, apoB...*), polypeptidové řetězce se označují římskými číslicemi (*A-I, A-II*) a případné izoformy apoproteinů arabskými číslicemi 1, 2...). V rutinní biochemické laboratorní praxi se stanovují zejména apoproteiny typu *A* a *B*.

Rovněž apoproteiny vykazují, jako jiné bílkoviny, *polymorfismus*, což má v některých případech závažné dopady na metabolismus lipidů a na zdravotní stav jedince (viz např. apoE).

**Hlavní funkcí apolipoproteinů je regulace metabolismu plazmatických lipidů a stabilizace lipidové emulze**, což je zajištěno zejména tím, že apolipoproteiny

- jsou, jak již bylo uvedeno, strukturálními částicemi amfipatických lipoproteinů, s hydrofobní stranou v kontaktu s vodním prostředím plazmy, což umožňuje *transport ve vodě nerozpustných lipidů*
- slouží jako *ligandy* (ve smyslu *ligand = signální spouštěcí molekula vázající se na vazebné místo cílového proteinu*). Vážou se na specifické lipoproteinové receptory na povrchu prakticky všech somatických buněk. Vazba apoproteinu na lipoproteinový receptor je *prvním krokem k využití lipidů buňkou*
- některé apoproteiny (*apoA-I, C-I a C-II*) jsou *kofaktory lipolytických enzymů* (lecitin:cholesterol acyltransferázy = *LCAT*, lipoproteinové lipázy = *LPL*) a zúčastňují se tak přímo lipoproteinového metabolismu.

### Schematické znázornění lipoproteinů



Petar Alaupovic, Ph.D.



### 14.5.1. Apoproteiny a jejich základní charakteristiky

#### ApoA-I je hlavní komponentou třídy HDL

Tvoří se v tenkém střevě a v játrech v přibližně stejných množstvích. Je to hlavní komponenta třídy HDL, tvoří přibližně 30% HDL částice. Hlavní fyziologickou funkcí je příjem/odnímání volného cholesterolu z buněk/buňkám a slouží také jako kofaktor v reakci LCAT. Tyto procesy jsou důležité pro transport cholesterolu zpět do jater, což je činnost známá jako *reversní cholesterolový transport*. Je to hlavní antiaterogenní a antioxidační faktor v HDL.

#### ApoA-II je druhou hlavní komponentou třídy HDL

Tvoří se podobně jako apoA-I v tenkém střevě a v játrech. Je to druhý nejznámější apolipoprotein třídy HDL.

#### ApoA-IV se nalézá především v chylomikronech

Tvoří se v tenkém střevě (i když syntéza probíhá i v hypotalamu) a syntéza ve střevě je podporována aktivní absorpcí lipidů. Nalézá se především ve vazbě s chylomikrony, ale také v malých HDL a ve frakci séra neobsahující lipoproteiny. ApoA-IV je aktivátorem LCAT.

#### ApoB je hlavní komponentou LDL a IDL, je rovněž důležitou komponentou VLDL a chylomikronů a vyskytuje se ve dvou formách

- *apoB100*, která se nachází ve VLDL a LDL, tvoří se v játrech; vazby s lipidovým jádrem částice jsou extrémně stabilní; zřejmě díky této silné vazbě k lipidovému jádru se *apoB nevyměňuje během metabolismu mezi jednotlivými lipoproteiny*
- *apoB48*, která se nachází v chylomikronech a tvoří se v játrech jako *N-terminální polovina apoB100*.

ApoB se zdá být nezbytným pro tvorbu lipoproteinů bohatých triacylglyceroly (CL, VLDL), současně je také ligandem *B, E receptoru* (zvaného též *LDL receptor*).

**Existuje genetický polymorfismus apoB**, vedoucí k různým afinitám k tomuto receptoru a tím následně k různým rychlostem katabolismu LDL v buňkách. Platí: čím pomalejší katabolismus, tím vyšší aterogenita částice.

#### ApoC se vyskytuje především v HDL

Tvoří se převážně v játrech. Tato třída apolipoproteinů obsahuje tři malé peptidy značené C-I, C-II a C-III, které se téměř vždy vyskytují pospolu. Nacházejí se především v HDL. C-I aktivuje LCAT a inhibuje fosfolipázu A<sub>2</sub>, C-II je hlavním kofaktorem lipoproteinové lipázy (LPL) a C-III chrání tzv. zbytky (*remnants*) od předčasného odklizení játry tím, že naopak aktivitu endoteliální lipoproteinové lipázy inhibuje.

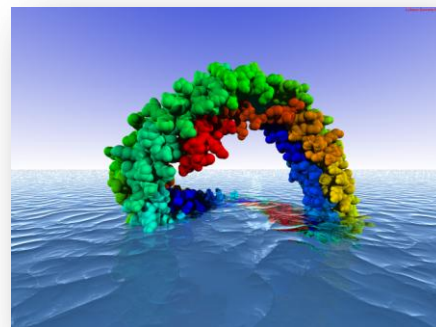
#### ApoE je rovnoměrně rozdělen mezi částice VLDL a HDL

Tvoří se převážně v játrech a je distribuován rovnoměrně mezi VLDL a HDL částice. Podobně jako u apoC dochází i u apoE k výměnám mezi těmito hustotními třídami. Působí jako ligand pro dva rozdílné receptory, a to pro zbytkový (remnant) receptor a pro B,E receptor.

**Existuje genetický polymorfismus apoE**: jsou známy 3 alely (označené  $\epsilon$ -2,  $\epsilon$ -3 a  $\epsilon$ -4) jejichž produktem jsou tři proteiny lišící se v jedné aminokyselině a v afinitě k receptoru. Alela  $\epsilon$ -2 provází hypetriglyceridémii a alela  $\epsilon$ -4 hypercholesterolémii.

**Apoprotein(a)** (apoprotein „malé a“) je **vysoce aterogenní**. Je to glykoprotein s vysokým obsahem kyseliny neuraminové, rozpustný ve vodě. Molekulová hmotnost je variabilní a pohybuje se mezi 300 až 700 kD. Je syntetizován v játrech.

**Kyselina neuraminová** je kondenzační produkt mannosaminu a pyruvátu, součást glykoproteinů a glykolipidů.



Umělecké ztvárnění molekuly Apolipoproteinu AI  
(Apo AI ve vodě)  
<http://www.komsta.net/chemwalls/apolipo2-1280.jpg>

**14.5.1.1. Metody stanovení apolipoproteinů**

Pro prognostiku vývoje poruchy v metabolismu lipidů má význam především stanovení *apolipoproteinu A-I* a *apolipoproteinu B (apoB100)*. Tyto bílkoviny se stanovují imunochemicky, v rutinní praxi většinou (homogenní) zákalovou metodou v roztoku, tj. turbidimetricky (imunoturbidimetrie). Používají se specifické protilátky od různých výrobců (Dako, Orion, Immunotech aj.), většinou vázané na latexové částice ((PETIA, viz kapitola 10, str.10-21). Metody lze aplikovat na automatické biochemické analyzátoři, případně lze používat specializované fotometry různých výrobců i běžné fotometry či nákladnější, ale přesnější, nefelometry. V současné době se od stanovení apoA i apoB v rutinní praxi upouští a provádí se spíše ve specializovaných laboratorních provozech navázaných na příslušné odborníky (metabolické poradny).

**Hodnoticí meze:**

	ApoA1		ApoB
	Muži	Ženy	
Dolní mez:	1,00 g/l	1,10 g/l	0,50 g/l
Horní mez:	1,70 g/l	1,90 g/l	1,00 g/l

**Některé základní vlastnosti apolipoproteinů**

Výskyt	Apolipo protein	Místo syntézy	Molekulární hmotnost [D]	Počet aminokyselin	Chromozom	Funkce	Střední normální koncentrace v plazmě [mg/l]
HDL, chylomikrony	A-I	Tenké střevo, játra	28 300	243	11	Aktivace lecitin cholesterol acyltransferázy (LCAT), transport lipidů, ligand pro HDL receptor, stabilizace prostacyklinů, strukturální bílkovina	1000 – 1600
HDL	A-II	Tenké střevo, játra	17 000	77	1	Strukturální bílkovina, ligand pro HDL receptor, aktivace jaterní lipázy?	300 – 500
Chylomikrony HDL, VLDL, frakce séra s volnými lipoproteiny	A-IV	Tenké střevo	46 000	376	?	Aktivace LCAT, ligand pro HDL receptor, metabolismus triacylglycerolů	asi 150
LDL, VLDL	B 100	Játra	549 000	4536	2	Sekrece triacylglycerolů a cholesterolu z jater a tenkého střeva, absorpce lipidů, vazba na B/E receptor, aktivace lysolecitin acyltransferázy	500 - 900
Chylomikrony	B 48	Tenké střevo	265 000	-	2	Vazba na B,E-receptor	
Chylomikrony VLDL, HDL	C-I	Játra, nadledviny	6 500	57	19	Potlačení vazby vznikajících lipoproteinů na LDL receptor a na LRP, aktivace LCAT	<100
Chylomikrony VLDL, HDL	C-II	Játra	8 800	79	19	Aktivace LPL	30 – 80
Chylomikrony VLDL, HDL	C-III 0,1,2	Játra	8 900	99	11	Inhibice LPL aktivity, interference s lipoproteiny na jaterních receptorech	80 – 150
HDL3		Ledviny, pankreas, střevo, mozek, varlata, nadledviny	2 000	-	3	LCAT aktivátor	asi 100
VLDL, chylomikrony		Játra, periferní tkáň	36 500	299	19	Vazba na B/E a E receptory Odstranění cholesterolu s periferních buněk	30 – 50
Lp(a)		Játra	270 000 - 700 000		8	?	<300

### 14.5.2. Lipoproteiny a jejich základní charakteristiky

Již v úvodu kapitoly byla naznačena (víceměně jednotná) stavba jednotlivých tříd lipoproteinů. Následující tabulky přehledně uvádějí průměrné složení jednotlivých lipoproteinů a jejich vlastnosti.

#### Složení jednotlivých tříd lipoproteinů

	CHYLOMIKRA	VLDL	LDL	HDL
<b>Apoprotein</b>	<b>C, B, A</b>	<b>C, B</b> (E, D, A)	<b>B</b> (C, E, D, A)	<b>A</b> (C, B, D, E)
<b>Triacylglyceroly</b>	0,86	0,53	0,06	0,04
<b>Cholesterol</b>	0,02	0,07	0,08	0,04
<b>Cholesterol-ester</b>	0,03	0,14	0,42	0,15
<b>Fosfolipidy</b>	0,07	0,18	0,22	0,30
<b>Proteiny</b>	0,02	0,08	0,22	0,47

#### Další pohled na některé vlastnosti lipoproteinů

Lipoprotein	Flotace ( $\delta$ ) v [g/ml]	Obsah lipidů (L) [%]	Obsah proteinů (P) [%]	Poměr P/L
<b>Chylomikra</b>	0,95 g	98 – 99,5	9,5 – 2	1 : 100
<b>VLDL</b>	0,95 – 1,006	90 – 92	8 - 10	1 : 9
<b>IDL</b>	1,006 – 1,019	různý	různý	není konstantní
<b>LDL</b>	1,019 – 1,063	80	20	1 : 4
<b>HDL</b>	1,063 – 1,210	50	50	1 : 1
<i>HDL<sub>1</sub> (HDL<sub>C</sub>)</i>	1,055 - 1,085			
<i>HDL<sub>2</sub></i>	1,063 – 1,120			
<i>HDL<sub>3</sub></i>	1,120 – 1,210			
<b>Lp(a)</b>	1,055 – 1,110	80	20	1 : 4

**Vysvětlivky:** V horní tabulce je uvedeno procentové zastoupení jednotlivých lipidů a celkových proteinů; je uvedeno zastoupení apoproteinů (před závorkou je uvedena převažující složka); uváděné složení jednotlivých lipoproteinů se může poněkud lišit podle autorů. V dolní tabulce jsou některé aspekty horní tabulky rozvedeny podrobněji.

**Poznámka:** Flotace odkazuje na ultracentrifugaci v *solném gradientu*: částice se „vznášejí“ tj. „flotují“ v roztoku o uvedené hustotě, čili v podstatě vyjadřuje relativní hustotu konkrétní třídy částic. Tato hustota se pohybuje mezi hustotou lipidů (<99 g/ml) a hustotou bílkovin (>1,28 g/ml). Rozdíly v hustotě jsou způsobeny různým poměrem protein-lipid (P/L) v jednotlivých částicích. Čím větší obsah lipidů, tím lehčí částice.

### 14.5.3. Metabolismus lipoproteinů je komplikovaný

Během metabolismu lipoproteinů dochází v krevním řečišti k intenzivním výměnám mezi jednotlivými třídami lipoproteinů, a to jak apoproteinů (zejména C rodiny), tak lipidů (cholesterolu, triacylglycerolů, fosfolipidů). Tyto výměny úzce souvisí s intravaskulární degradací lipoproteinů a jejich využitím periferními tkáněmi. Je důležité připomenout si, že regulace metabolismu plazmatických lipidů je jednou ze tří hlavních funkcí apoproteinů, bílkovinné složky lipoproteinu.

#### Klíčovou roli v metabolismu lipoproteinů hrají lipoproteinové receptory

Lipoproteinové receptory na povrchu buněk jsou *rozhodující pro udržení homeostázy plazmatických lipoproteinů a pro buněčný metabolismus*.

**Nejlépe prozkoumaným je LDL receptor (LDLR, apoB,E receptor).**

Jedná se o glykoprotein (o 839 aminokyselinách) vyskytující se na většině tělesných buněk. Patří do tzv. *rodiny LDL receptorů*, která obsahuje celkem sedm členů. Prostřednictvím tohoto receptoru se dostává cholesterol (endocytózou) dovnitř buňky. Pro vazbu na receptor je nutný apoB100, hlavní apoprotein třídy LDL. Receptor rozeznává i apoE, který je součástí chylomikronových zbytků (*chylomicron remnants*) a IDL (*VLDL remnants*). Má dvě funkce: poptávkou regulované doručení cholesterolu do buněk a tkání a regulaci hladiny cholesterolu v krevním řečišti.

LDL receptory syntetizuje buňka při nedostatečné nabídce cholesterolu. Volný cholesterol inhibuje syntézu jak receptorů, tak HMG-CoA reductázy (*viz*), tzn., že *počet receptorů je regulován obsahem cholesterolu a požadavky buněk na cholesterol*. Nedostatek cholesterolu vyvolá v buňce jak syntézu vlastního cholesterolu, tak syntézu receptorů. Naopak přebytek cholesterolu je *acylCoA-acyltransferázou* (ACAT) esterifikován mastnými kyselinami a převeden tak na skladovací (depotní) formu. To chrání buňky před jejich zahlcením volným cholesterolem.

**Za identifikaci LDL receptoru a jeho vztahu k metabolismu cholesterolu a familiární hypercholesterolemii** obdrželi v roce 1985 Michael Stuart Brown a Joseph Leonard Goldstein Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu.

**Pro zvědavé studenty:** Kromě apoB100, hlavního apolipoproteinu LDL, váže LDL receptor také apoE, a proto se nazývá také *apoB100-E receptor*. Lipoproteiny bohaté apoE se vážou 100x silněji, čehož výsledkem je akcelerace vychytávání VLDL zbytků a IDL.

Nejvyšší *hustota* receptorů je v nadledvině a ve vaječnících, ale nejvyšší *počet* receptorů LDL obsahují játra. LDL receptory se kupí v tzv. *coated pits* (potažených jamkách, viz obrázek na str. 11-31), které se po vazbě LDL dostanou do nitra buňky ve formě endosomů (*buněčná organela, do níž putují endocytotické váčky*). Uvnitř buňky se receptory oddělí od ligandů a mohou být znovu použity (recyklace receptorů). Endosomy se sloučí (sfúzíjí) s lysosomy, které obsahují paletu enzymů, schopných rozštěpit proteiny a lipidy, zvl. estery cholesterolu.

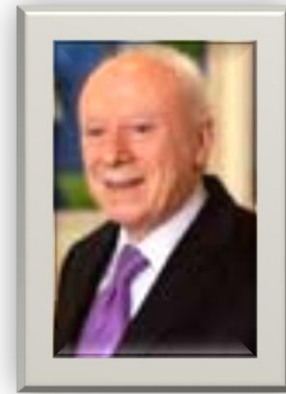
**Pro zvědavé studenty:** Pacienti s kongenitální receptorovou deficiencí jsou schopni katabolizovat chylomikronové zbytky a další lipoproteiny obsahující apoE. Umožňuje to *Lipoprotein receptor-related protein (LRP)*. LRP, který patří do rodiny LDL receptorů, je multifunkční: váže apoE, LPL, HTGL, apoB100 a apo(a). Nachází se v mnoha tkáních včetně neuronů a astrocytů. Vzhledem k velkému počtu ligandů je úkol tohoto receptoru zřejmě daleko širší než jen pouhé čištění od chylomikronových zbytků.

**VLDL receptor je transmembránový lipoprotein**, který také patří do rodiny LDL receptorů, se nachází v endoteliálních buňkách mimojaterních orgánů (srdce, kosterní svalstvo, mozek, makrofágy), v játrech se nevyskytuje. Objeven byl v roce 1992. Hraje důležitou roli při metabolismu cholesterolu, metabolismu lipoproteinů bohatých na triacylglyceroly obsahujících apoE a při *neuronové migraci* (*způsob, kterým neurony cestují z místa svého vzniku do své konečné pozice v mozku*) při vývoji mozku.

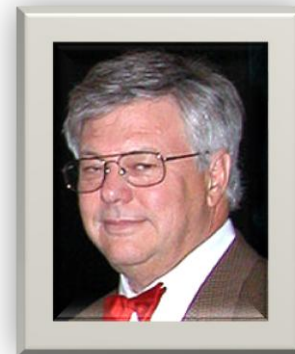
**Chylomikrony transportují triacylglyceroly přijaté potravou**

Chylomikrony jsou bohaté *triacylglyceroly* (přijaté potravou), které transportují. Z apoproteinů obsahují zejména A-I, A-II, A-IV a B48. ApoB48 se vyskytuje pouze v chylomikronech. Na séru stojícím přes noc při 4 °C tvoří chylomikrony krémovou vrstvu.

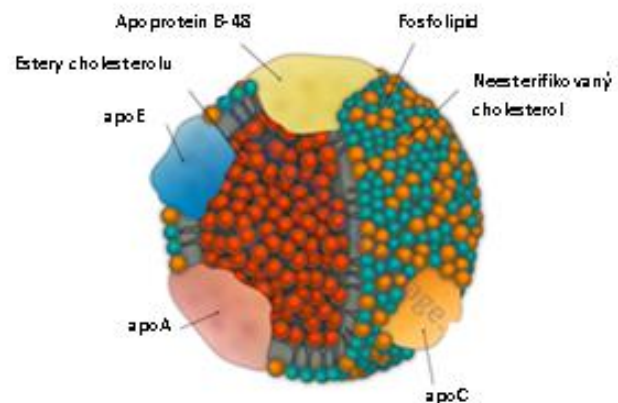
Chylomikrony se tvoří v tenkém střevě v buňkách střevní mukózy, především jako reakce na lipidy přijaté potravou. Syntéza neprobíhá kontinuálně a závisí na množství neutrálních tuků, které mají být absorbovány. Proteiny a fosfolipidy spoluprotvořící chylomikrony jsou syntetizovány v enterocytech. Kapacita syntézy je omezena, takže se vrůstající nabídkou triacylglycerolů nedochází k produkci vyššího počtu částic, ale k růstu jejich velikosti (až do 1 μm). Chylomikrony vstupují do systémové cirkulace prostřednictvím *ductus thoracicus* (hrudní mízovod sbírající mízu/lymfu z většiny organismu a ústící do žilního systému) a poté recirkulují do jater. Po vstupu do krve ztrácejí apoA-IV a apoA-I



J. L. Goldstein



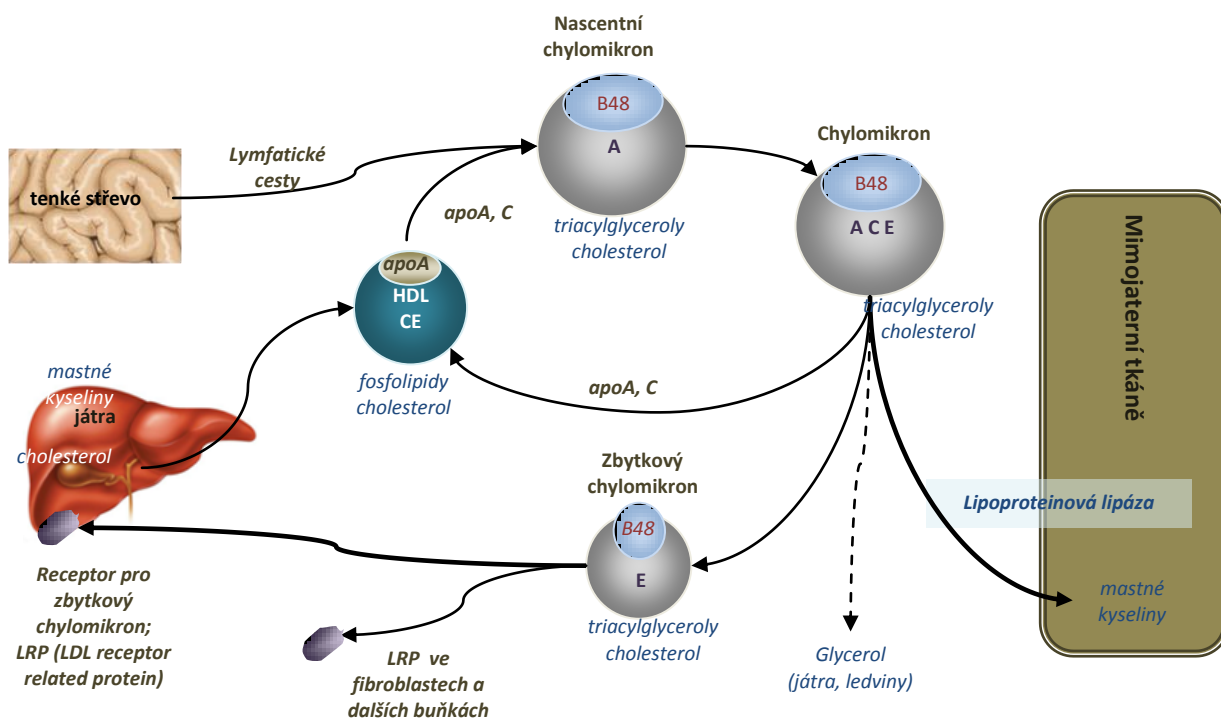
M. S. Brown

**Chylomikron**

Chylomikron je typickým představitelem lipoproteinových částic

a naopak získávají apoC a apoE z HDL částic. ApoC-II aktivuje v přítomnosti fosfolipidů lipoproteinovou lipázu (LPL) v kapilární stěně, která hydrolyzuje většinu triacylglycerolů v jádru chylomikronů. Uvolněné mastné kyseliny jsou vychytávány zejména tukovou tkání a svalovými buňkami, glycerol je dopraven do jater a do ledvin, kde je přeměněn na meziprodukt metabolismu glycidů, *dihydroxyaceton fosfát*. Během odevzdávání mastných kyselin jsou povrchové komponenty (apoC, apoA-I a také určité množství volného cholesterolu a podstatná část fosfolipidů) uvolněny a převedeny do částic HDL. Ztráta apoC-II zabraňuje lipoproteinové lipáze v další degradaci chylomikronových zbytků (*remnants*). Chylomikronové zbytky (*remnants*), které obsahují zejména estery cholesterolu, apoE a apoB-48, jsou pak transportovány do jater, kde jsou degradovány. Částečně jsou zachytávány i fibroblasty a dalšími buňkami. Vazebné receptory jsou specifické pro apoE, nacházejí se v hepatocytech, fibroblastech i dalších buňkách. Zbytkové (remnantní) chylomikrony jsou pro hepatocyty hlavním zdrojem exogenního cholesterolu.

### Metabolismus chylomikronů



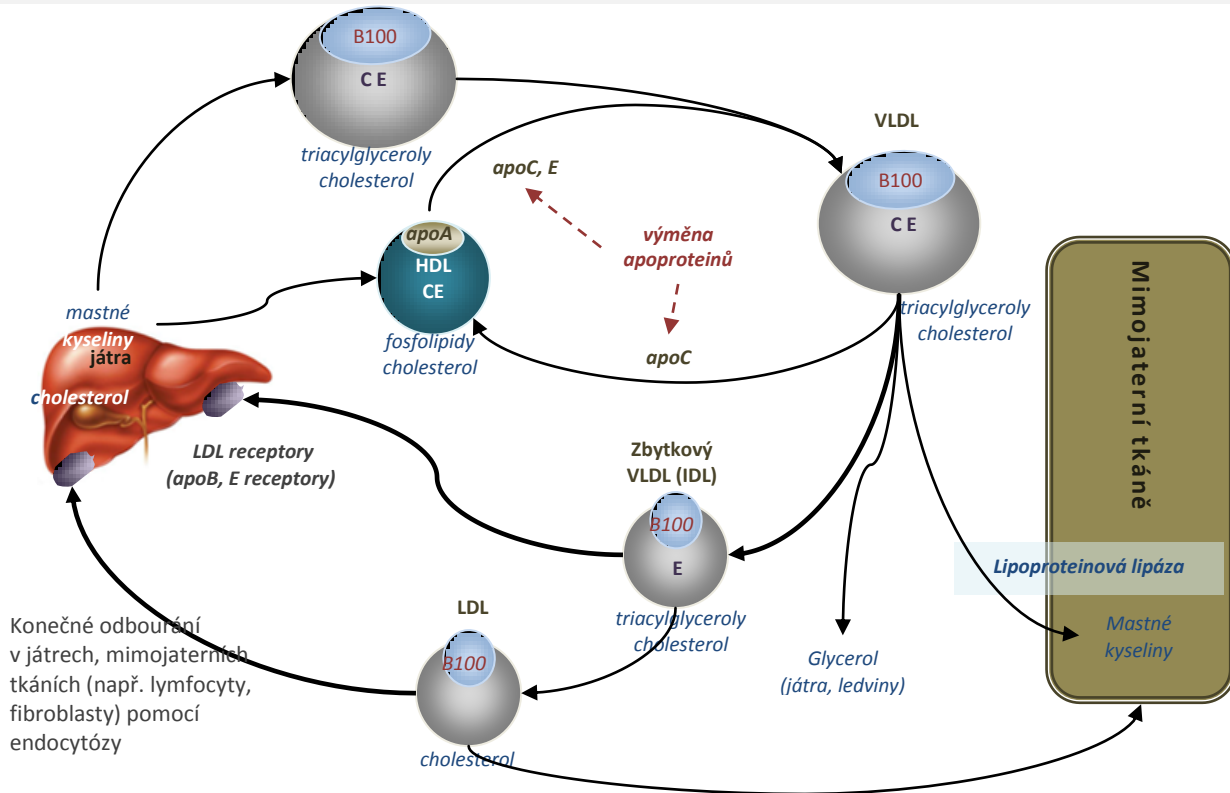
**Poznámka:** cholesterolem se rozumí volný i esterifikovaný cholesterol; A, C, E, B48 = apolipoproteiny; pod částicemi jsou uvedeny nejvíce zastoupené lipidy v těchto částicích.

**Remnant** (angl.) = zbytky, pozůstatky (*čeho*); zbytek; zbývající. **Výslovnost:** [remn<sub>e</sub>nt]

Koncentrace chylomikronů v krvi, jejichž biologický poločas je asi půl hodiny, vrcholí ve zdravém organismu za 3 – 6 hodin po jídle. K úplnému odbourání dochází po 9 hodinách. Přítomnost chylomikronů po dvanáctihodinovém lačnění (viz *preanalytická fáze při stanovení lipidů* – str. 11- 26) je patologická a její příčinou může být nedodržení zásad preanalytické fáze (nedodržení stanovené doby pro příjem potravy), nadměrný příjem alkoholu v předchozích dnech, případně chronický alkoholismus s jaterní steatózou, dekompenzovaný diabetes mellitus, nebo může jít o vrozenou vadu, jakou je vrozený defekt lipoproteinové lipázy nebo vrozený defekt apolipoproteinu C-II (jak víme, jde o aktivátor lipoproteinové lipázy). Vlastní chylomikrony nejsou aterogenní, ale jejich zbytky, remnants, jsou silně aterogenní. Mají sice velmi krátký biologický poločas, ale pokud je katabolismus chylomikronů zpomalen, vznikají remnanta bohatší cholesterolem a s menším obsahem triacylglycerolů a tyto částice výrazně zvyšují riziko kardiovaskulárních onemocnění. Laboratorně se mohou v tomto případě nacházet mírně zvýšené koncentrace triacylglycerolů, případně i celkového cholesterolu.

**VLDL transportují většinu jaterních triglyceridů** Tvoří se v játrech a transportují většinu *triacylglycerolů* tvořených (endogenní) lipogenesou, ke které dochází, když příjem tuků a sacharidů překročí potřeby organismu. Cholesterol nutný pro syntézu získávají z chylomikronových zbytků, IDL, LDL, HDL nebo z endogenní syntézy v hepatocytu. Z cirkulujících částic HDL se nově vytvořené částice VLDL také obohacují o apoproteiny C a apoE. Apoproteiny VLDL jsou apoB100, apoC-I, apoC-II, apoC-III a apoE. Kromě triacylglycerolů obsahují také trochu cholesterolu a jeho esterů. Triacylglyceroly jsou dopravovány do různých tkání, přednostně do tkáně svalové a tukové, kde jsou skladovány nebo použity k produkci energie. Předpokládá se, že část VLDL může být katabolizována prostřednictvím zmíněného tkáňového VLDL receptoru, většina VLDL se degraduje na IDL částice.

### Metabolismus VLDL



Biologický poločas VLDL je asi 2 – 4 hodiny. VLDL mají menší proaterogenní potenciál než IDL a LDL, jejich zvýšená koncentrace v krvi však znamená také zvýšené riziko kardiovaskulárních onemocnění. Laboratorně se projevuje zvýšenou koncentrací triacylglycerolů, při závažnější poruše i celkového cholesterolu. Příčiny zvýšení frakce VLDL mohou být hypotyreóza, dekompenzovaný diabetes mellitus, hyperkorticismus, estrogeny, renální insuficience, vysoký přívod sacharidů, obezita, alkoholismus, vrozená hyperglyceridemie, vrozená kombinovaná hyperlipidemie.

### IDL se tvoří při metabolismu VLDL

Lipoproteiny o střední hustotě, IDL, jsou degradačním produktem metabolismu lipoproteinů VLDL, kterým byla odebrána část triacylglycerolů. U zdravých jedinců se vyskytují ve velmi nízkých koncentracích. Jsou vychytávány převážně játry (receptor pro apoE) a degradovány. Část IDL je působením jaterní lipázy zbavena většiny zbývajících triacylglycerolů (jsou hydrolyzovány) a IDL se mění na částice LDL. Jsou katabolizovány v játrech i v mimojaterních tkáních. Část IDL se působením jaterní lipázy, která z nich odštěpuje další část triacylglycerolů, mění na lipoproteiny o nízké hustotě, LDL.

IDL mohou výrazně akcelarovat aterosklerózu, vzhledem k velmi krátkému biologickému poločasu se však u zdravého jedince tímto způsobem neprojevují. Opačně tomu je v případě, že jejich koncentrace v krvi je zvýšená, jako tomu může být při vrozené hyperlipoproteinemii typu III (izolované zvýšení IDL), případně u hypotyreózy nebo zvýšené syntézy či zpomalené degradaci VLDL (zde jsou zvýšeny i další lipoproteiny).

### LDL přenášejí většinu cholesterolu nacházejícího se v krvi

LDL jsou degradačním produktem IDL. Obsahují jediný apoprotein, apoB100. Přenášejí většinu *cholesterolu* nacházejícího se v krvi a dodávají ho periferním tkáním. Do buněk vstupují prostřednictvím LDL receptorů (zvaných též *apoB, E receptory*), na které se váže apoB100. LDL částice se liší ve velikosti, hustotě, složení a fyzikálně chemických vlastnostech.

**Lze rozlišit až 15 různých frakcí**, ale většinou se rozlišují *velké lehké* LDL<sub>1</sub> (obsahují kolem 2750 molekul cholesterolu na jednu apoB molekulu), *malé husté* LDL<sub>3</sub>, (obsahují kolem 650 cholesterolových molekul na molekulu apoB) a *intermediární* LDL<sub>2</sub>, s vlastnostmi mezi výše jmenovanými LDL.

Složení v LDL částicích se liší od osoby k osobě. U lidí s normálními hodnotami lipidů se nachází přibližně stejné množství velkých a malých LDL. LDL<sub>3</sub> obsahují méně cholesterolu než ostatní dvě skupiny a i při jejich zvýšené hodnotě v krvi může být cholesterolémie normální, což neplatí pro apoB100, jehož hodnoty bývají v těchto případech často zvýšeny. LDL<sub>3</sub> mají zpomalený metabolismus, snadno pronikají přes cévní endotel, snadno podléhají oxidacím. Jsou velmi aterogenní. LDL jsou odbourávány v játrech (asi 2/3) a v periferních buňkách (asi 1/3). LDL pozměněné (např. glykací nebo oxidací) LDL receptory nerozpoznají a jsou katabolizovány tzv. *scavengerovými receptory* (viz obrázek na str. 11-16). Přes scavengerové receptory jsou odbourávány i malé husté částice LDL (LDL<sub>3</sub>). Tyto receptory se nacházejí na makrofázích a na buňkách cévního endotelu. Tato cesta katabolismu LDL urychluje rozvoj aterosklerózy. Příčinou zvýšené koncentrace LDL v krvi může být strava bohatá na cholesterol a nasycené tuky, obezita, hypotyreóza, nefrotický syndrom, familiární hypercholesterolemie, familiární defekt apoB<sub>100</sub>, polygenní hypercholesterolemie, vrozená kombinovaná hyperlipidémie aj. Poslední výzkumy ukazují, že mohutným zdrojem malých částic LDL je strava bohatá na sacharidy.

**Pro zvědavé studenty:** LDL dopravuje do periferních buněk cholesterol a další LDL složky, včetně vitamínů rozpustných v tucích, velká část LDL však znovu prochází játry. Přibližně 60-90% katabolismu LDL je zprostředkováno receptory, 10-40% je odstraňováno z plazmy tzv. *odklízací/scavenger cestou* (ta je částečně znázorněna na obrázku na str. 11-15 a popsána na str. 11-16). Rozsah katabolismu LDL závisí jak na *apoB, E receptorech*, tak na *afinitě* ligandu apoB. Bodová mutace genu produkujícího apoB100 má za následek značně sníženou schopnost vazby LDL na receptor. Vzhledem k tomu, že každá LDL částice obsahuje pouze jednu apoB100 molekulu, *může tato mutace ovlivnit polovinu všech LDL částic*. Tyto částice pak v krvi převládají, protože jsou degradovány mnohem pomaleji. Malé částice LDL se vážnou méně efektivně prostřednictvím *receptoru B100 E*, přežívají tedy v krevním oběhu déle, více podléhají změnám, a proto *jsou více aterogenní* než velké částice LDL. Tyto malé LDL částice *jsou rovněž spojeny s diabetem mellitus*. Jejich přítomnost je předzvěstí vzniku diabetu 2. typu. Při převaze malých LDL částic se rovněž vyskytuje hypertriglyceridémie a snížená koncentrace HDL cholesterolu. Zvýšený výskyt malých LDL částic je spojen jak s již zmíněným diabetem 2. typu, tak se vzrůstajícím věkem, s nesprávnou dietou (dieta se sníženým obsahem tuků vede k redukcí těchto částic), do určité míry je i geneticky předurčen.

Jediným apoproteinem, který v částici během celého procesu zůstává, je apoB, který se v závěru stává prakticky jediným apoproteinem v LDL. Dá se říci, že apoB100 je exkluzivním apolipoproteinem LDL částic. Nedávné studie prokazují, že vše je trochu jinak - vznik malých hustých částic LDL je spojen s příjmem sacharidů, přičemž cholesterol a nasycené tuky nehrají tak vážnou roli jak se dosud předpokládalo.

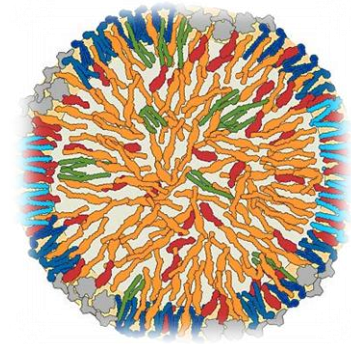
### HDL představuje velmi heterogenní populaci lipoproteinů

Tvoří se v prekurzorové formě (prvotní *diskoidní* forma) v tenkém střevě a v játrech a částečně při metabolismu chylomikronů a je přeměňován na konečnou (sférickou) formu v plazmě. HDL představují velmi heterogenní populaci lipoproteinů. Jednotlivé částice mají různou velikost, různý proteinový obsah a lipidovou skladbu a zřetelně se liší ve svých funkcích. Podle složení, morfologie a funkčních vlastností se rozlišují tři subfrakce: HDL<sub>1</sub>, zvaná též HDL<sub>C</sub>, dále HDL<sub>2</sub> a HDL<sub>3</sub>. Přitom neobsahují žádnou specifickou složku, která by zůstávala v částici v konstantním množství. Vystopovat metabolické cesty HDL je proto velmi nesnadné.

#### HDL částice mají několik funkcí

- jednou z hlavních je získávání cholesterolu z periferních tkání a jeho transport zpět do jater, kde může být s konečnou platností přeměněn na žlučové kyseliny a vyloučen; této roli se říká *reverzní transport*

Schematický molekulární model LDL částice



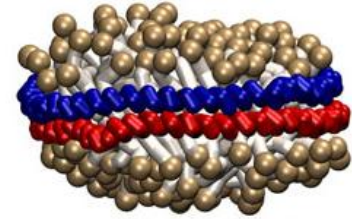
Jednotlivé barvy představují  
 tmavě modrá = fosfatidylcholin  
 světle modrá = sfingomyelin  
 tmavě žlutá = estery cholesterolu  
 červená = cholesterol  
 zelená = triacylglyceroly  
 šedá = apolipoprotein B-100

Zdroj:

<http://www.lce.hut.fi/research/sys/bio/biospectroscopy/lipoprotein/>

*cholesterolu (RCT)* a představuje hlavní ateroprotektivní funkci této třídy lipoproteinů; tuto funkci dále posiluje skutečnost, že HDL částice vykazují, zejména díky přítomnosti výše jmenovaných enzymů a faktorů, také protizánětlivé, antioxidační a vasodilatační účinky; nejmarkantnější ateroprotektivní účinky mají malé husté částice, označované jako HDL<sub>3</sub>

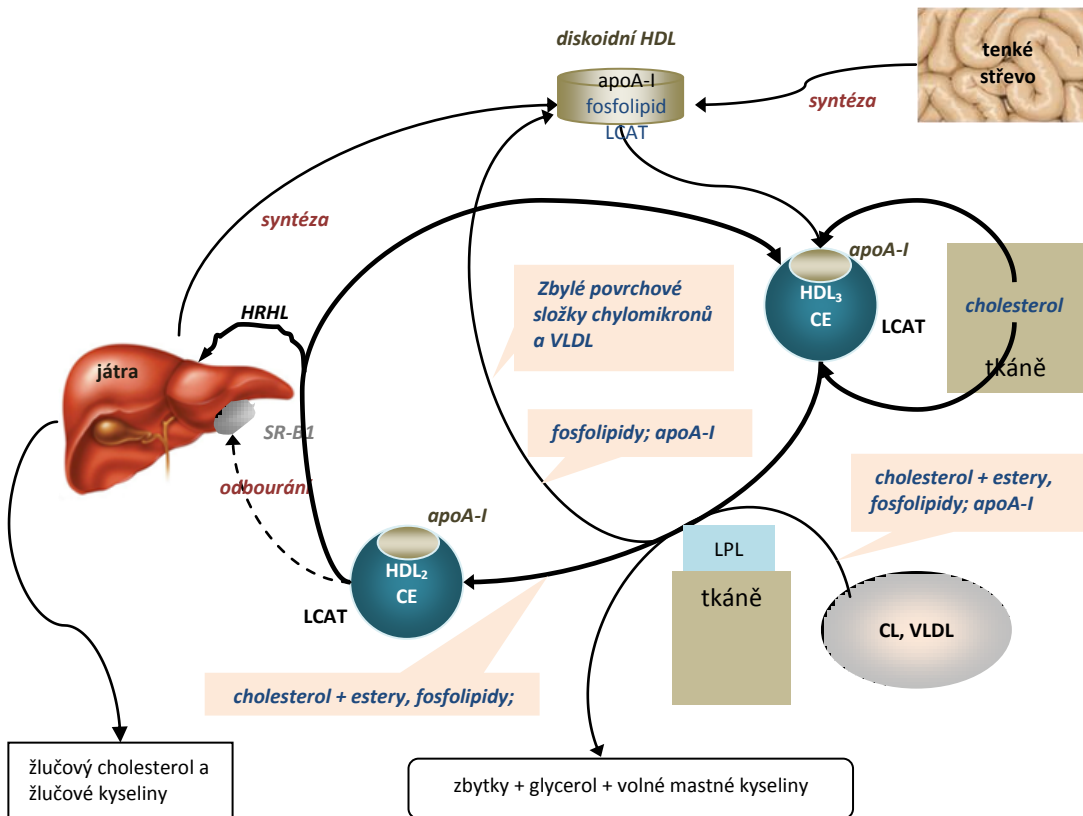
- další důležitou funkcí HDL je fungovat jako cirkulující zásobárna apoC-I, apoC-II a apoE
- HDL částice vykazují navíc i vlastnosti antiapoptotické, antitrombotické a antiinfekční.



Diskoidní HDL

Prvotní proteinovou složkou HDL je apoA-I, který se tvoří v játrech a v enterocytech tenkého střeva. Nejprve vytváří částice téměř bez volného cholesterolu a jeho esterů. Postupný sběr lipidů a cholesterolu z periferních tkání vede k tvorbě *nascentního* (tj. nově vytvořeného) *diskoidního HDL*: lipidy jsou uspořádány do dvou vrstev, obtočených (nejčastěji) dvěma provazci bílkovin, takže výsledná konstituce se v elektronovém mikroskopu jeví jako disk. Proto se nazývá *diskoidní HDL*. Při svém dalším účinkování se HDL chová jako podomní obchodník, který cestou sbírá volný cholesterol z periferních buněk, upravuje ho (tvorba esterů cholesterolu) a (v této formě) uskladňuje, aby ho vzápětí vyměnil za triglyceridy, a přitom si také čile vyměňuje s ostatními lipoproteiny své proteinové složky, apolipoproteiny.

### Metabolismus HDL



#### Legenda k obrázku pro zvědavé studenty

HDL se tvoří v játrech a ve střevu ve formě diskoidních struktur bohatých na proteiny, tvořených primárně z apoA-I. ApoA-I interaguje s přenašečem ABCA1 (tak, jak je na obrázku naznačeno pro makrofág) a extrahuje cholesterol z buněk. Cholesterol spojený s apoA-I je účinkem LCAT esterifikován. Tento proces vede k tvorbě částic HDL<sub>3</sub>. Částice HDL<sub>3</sub> se postupně obohacují cholesterolem a (účinkem LCAT) estery cholesterolu. Dále během cesty interagují s IDL a LDL, což je zprostředkováno CETP, který vyměňuje estery cholesterolu v HDL za triacylglyceroly z LDL. Tak se změní HDL<sub>3</sub> na HDL<sub>2</sub>. HDL může získávat cholesterol z buněk také interakcí s ABCG1 (viz poznámka 1 dole). Tímto způsobem získává HDL z buněk přibližně 20% cholesterolu. Z oběhu je HDL vyjmut vazbou na jaterní scavenger/odklížeč receptor SR-B1. Cholesterolem bohaté IDL a LDL se mohou vrátit do jater vazbou na receptor pro LDL (LDLR). Tvorba ROS vede k oxidaci lipidových složek LDL a tvorbě oxidovaných LDL (oxLDL), které jsou odstraňovány makrofágy prostřednictvím scavengerových/odklížeč receptorů FAT/CG36. Úloha ABCA1 v reverzním transportu cholesterolu je zřejmá u jedinců s defektem příslušného genu. Tito jedinci trpí *Tangierovou chorobou*, která je typická dvěma klinickými znaky, tonzilami přesycenými lipidy a nízkou hladinou sérového HDL.

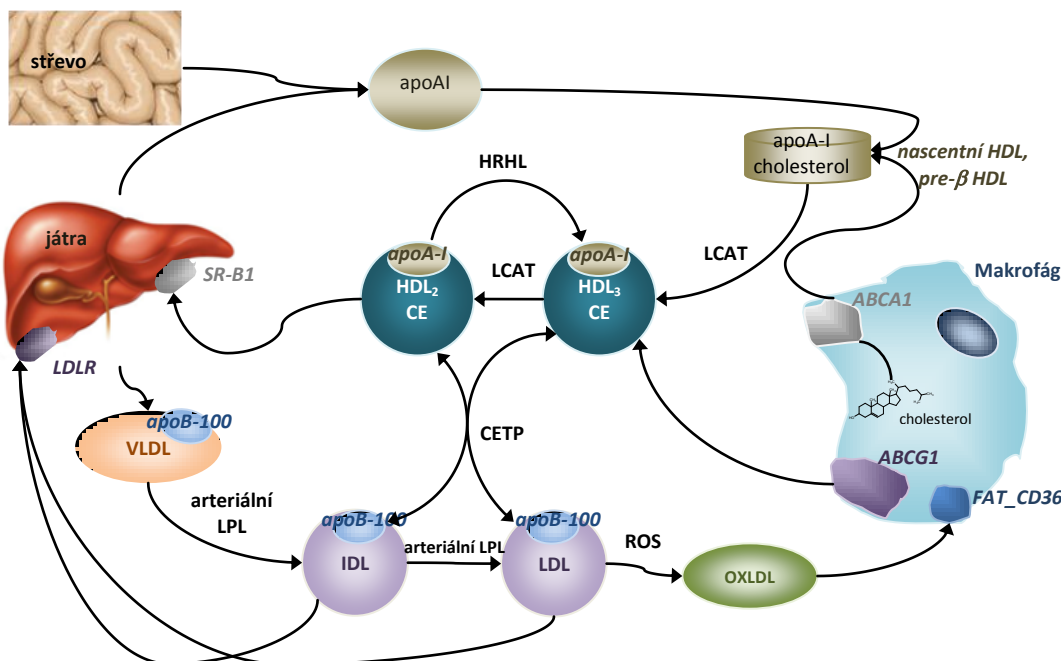
HRHL = heparinem uvolnitelná jaterní lipáza; LCAT = lecitin cholesterolová acyltransferáza; LPL = lipoproteinová lipáza; HRHL hydrolyzuje triacylglyceroly, ale také fosfolipidy na povrchu HDL<sub>2</sub>, uvolňuje cholesterol, který je zachycen játry, což umožňuje tvorbu malých a hustších HDL<sub>3</sub>. Aktivitu HRHL zvyšují androgeny a snižují estrogeny (vyšší koncentrace plazmatických HDL<sub>2</sub> u žen).



U poruch lipidového metabolismu (viz str.11 - 25) může být hladina HDL změněna, tzn. zvýšená, nebo snižena, může být ale i normální. Zvýšení koncentrace HDL v krvi mohou mít na svědomí jak genetická determinace, tak pravidelná fyzická aktivita, strava bohatá na vícenenasycené mastné kyseliny, alkohol a estrogény. Naopak snížení HDL může být způsobeno také genetickým základem, fyzickou inaktivitou, stravou bohatou na nasycené mastné kyseliny, kouřením, androgény, hyperglyceridemií.

**Nejdůležitější biologickou funkcí HDL je udržení cholesterolové homeostázy**, tj. odnímání volného cholesterolu periferním buňkám a jeho esterifikace, aby mohl být přenesen do VLDL, IDL a zbytků chylomiker a transportován do jater k eliminaci, kde mohou přímo končit i samotné HDL<sub>2</sub> částice. Tento děj je řízen tzv. **komplexe reverzního transportu cholesterolu**, který sestává z **lecitin cholesterolové acyltransferázy (LCAT)**, **apoproteinů A-I, E a D**, proteinů přenášejících lipidy (**protein přenášející estery cholesterolu – CETP**) a systému **monocyty/makrofágy**.

### Detaily interakcí mezi HDL a LDL



LCAT = lecitin cholesterolová acyltransferáza; HRHL = heparinem uvolnitelná jaterní lipáza; CETP = protein přenášející estery cholesterolu; ABCA1 = ASTP-binding cassette transport protein A1; ABCG1 = ASTP-binding cassette transport protein G1; ROS = reactive oxide specimens, tj. látky s reaktivním kyslíkem, např. kyslíkové ionty a peroxidy; LDLR = receptor pro LDL (apoB,E-receptor); FAT\_CD36 = odklízeč receptor; SR-B1 = jaterní odklízeč receptor

**Scavenger** podle anglického slovníku znamená *mrchožrout, zvíře živící se odpadem, počističovač ulic, vybírač popelnic* („kontyšák“) ap., což významově odpovídá úloze *scavengerových receptorů*. Výslovnost: [skævɪndʒə].

**Poznámka pro zvědavé studenty:** ABCA1, ABCG1, patří do tzv. ABC rodiny, resp. superrodiny, transportérů/přenašečů membránových proteinů, vyžadujících ke své činnosti energii z ATP. Obsahují oblast, na kterou se ATP váže. Energie získaná hydrolýzou ATP slouží k přenosu různých molekul přes buněčné membrány. Dělí se do sedmi skupin, značených písmeny A – G a každý člen má ještě své pořadové číslo (např. ABCG1, ABC přenašeč rodiny G, pořadové číslo 1. Právě přenos cholesterolu z povrchu buněčné membrány do HDL částic zahrnuje činnost ABCG1.

Stránka o HDL a video: <http://www.ks.uiuc.edu/Research/Lipoproteins/>

### Lipoprotein(a), Lp(a), obsahuje apoprotein(a)

**Lp(a) = s lipoproteinem asociovaný antigen); má obdobné složení jakou mají částice LDL, kromě apoB obsahuje navíc také apoprotein(a).** O metabolismu lipoproteinu(a) je známo poměrně málo.

**Pro zvědavé studenty:** Apo(a)-mRNA se nachází v játrech, ve stopách v mozku a ve varletech. Význam přítomnosti této nukleové kyseliny v posledních dvou jmenovaných orgánech je nejasný. Jediným významným místem syntézy apo(a) jsou játra. Játra jsou i nejvýznamnějším producentem apoB100, druhého apoproteinu nacházejícího se v Lp(a). Výsledky experimentů naznačují, že apo(a) je secernován hepatocyty a na LDL částice se váže extracelulárně. Degradace Lp(a) není jasná. Principiálně může být

Lp(a) vychytáván LDL receptorem, ale zdá se, že tato degradační cesta hraje pouze podřadnou roli *in vivo*. Do nedávna se předpokládalo, že místem degradace Lp(a) mohou být další členové rodiny LDL receptorů (tj. VLDL receptor, receptor pro protein příbuzný LDL, megalin). Bez ohledu na otázku molekulárního receptoru pro Lp(a) není zodpovězena ani otázka orgánu, ve kterém je Lp(a) štěpen. Pozornost se nyní upírá na ledviny, jako možné místo katabolismu Lp(a).

Lp(a) může mít přímý aterogenní účinek. Díky své strukturální podobnosti s plasminogenem může mít apo(a) trombogenní účinek. Mechanismus účinku aterogenního efektu však dosud není znám, existují vysvětlující hypotézy, které mají svá pro i proti.

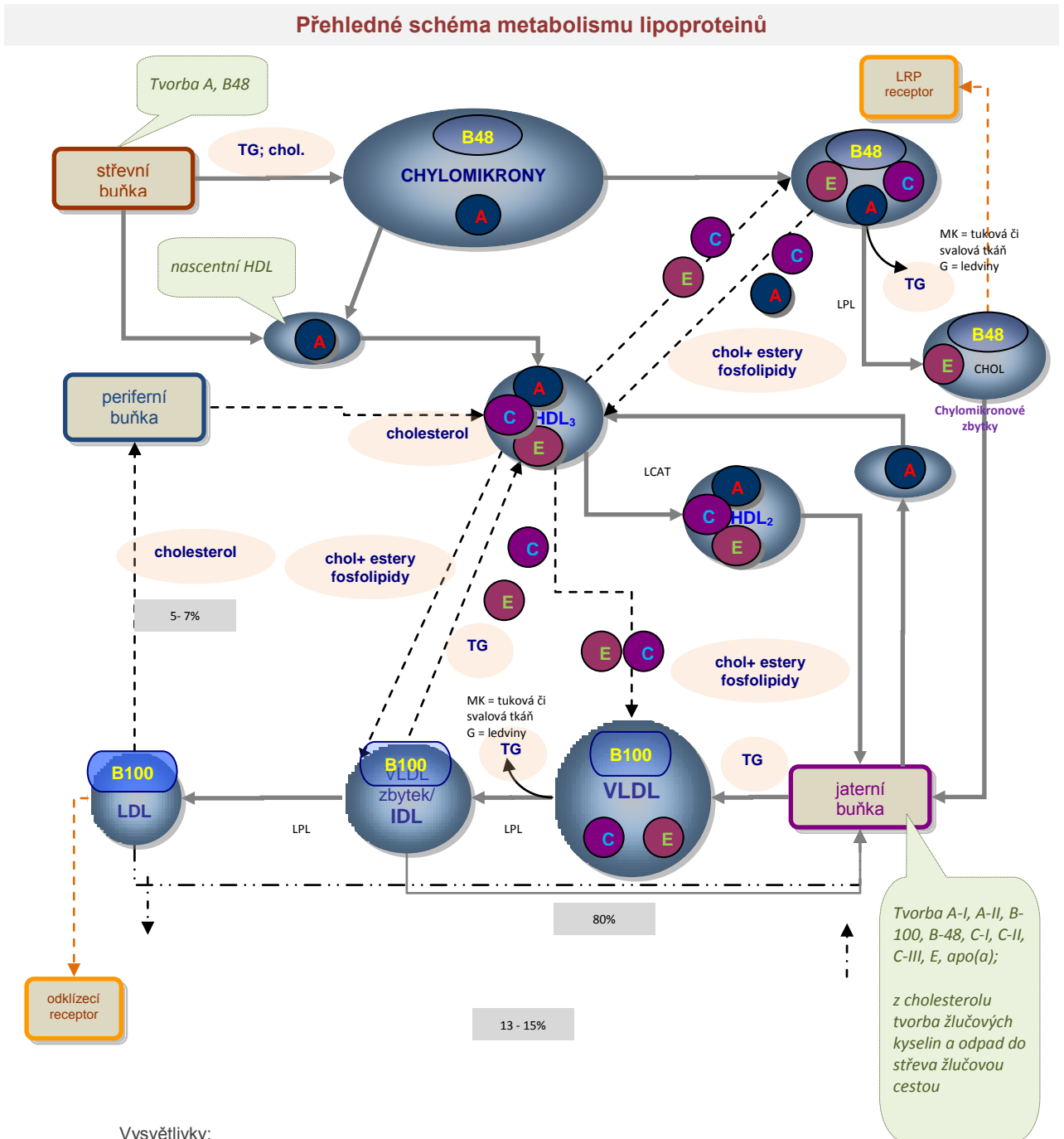
**Každopádně platí, že lidé s vysokým Lp(a) (nad 300 mg/l) a zvláště lidé s vysokým Lp(a) i LDL současně mají obzvláště vysoké riziko kardiovaskulárního onemocnění.**

### Přehled enzymů a transportní proteinů v lipoproteinovém metabolismu

V předchozím textu jsme se setkali s některými enzymy a transportními proteiny důležitými v metabolismu lipoproteinů a jejichž narušení může vést k patologickým stavům. Přehled a základní funkce jsou uvedeny v tabulce.

Enzym/protein	Kofaktor	Funkce
<b>Postheparinové lipázy (PHL)</b> <i>Lipoproteinová lipáza (LPL)</i>	ApoC-II	Hydrolýza exogenních triacylglycerolů v chylomikrech.
<i>Jaterní triacylglycerolová lipáza (HTGL)</i> <i>Fosfolipázy</i>	Žádný kofaktor	Hydrolýza triacylglycerolů a fosfolipidů v IDL a HDL.  Hydrolýza fosfolipidů, nejasná funkce v metabolismu lipoproteinů
<i>Lecitin-cholesterol-acyltransferáza (LCAT)</i>	ApoA-I (ApoA-IV, C-I, D)	Tvorba více jak 80% esterů cholesterolu z volného cholesterolu a lecitinu, konverze HDL <sub>3</sub> na HDL <sub>2</sub>
<b>Přenašečové proteiny</b> <i>Protein přenášející estery cholesterolu</i>  <i>Protein přenášející fosfolipidy</i>		Reaktant HDL/LCAT komplexu, výměna esterů cholesterolu z HDL za triacylglyceroly VLDL, výměna a přenos lipidů z jádra/core (částice)  Výměna fosfolipidů mezi lipoproteinovými třídami, účast v transportu vitamínů rozpustných v tucích (tj. vitamínu E)

Předchozí dílčí schémata vzájemných přeměn lipoproteinů jsou v následujícím schématu sloučena do zjednodušujícího přehledu.



### 14.5.4. Metody stanovení lipoproteinů

#### Ultracentrifugace

tj. centrifugace s vysokou odstředivou silou (*g*), v hustotním gradientu, v běžné rutinní praxi se nepoužívá; dělení do tříd je uvedeno výš, jednotlivé frakce se dělí podle své hustoty.

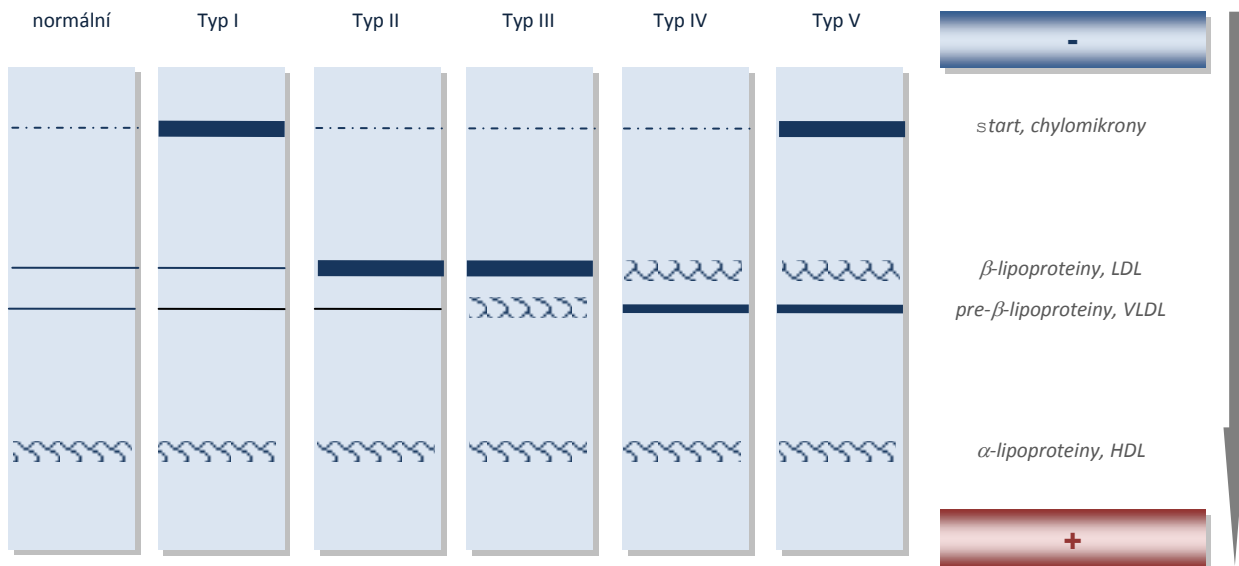
#### Elektroforetické dělení

na různých nosičích. Elektroforeticky se rozdělí lipoproteiny do čtyř tříd, které odpovídají dělení podle výsledků ultracentrifugace (viz závorka):

- chylomikrony (chylomikrony)
  - β-lipoproteiny (LDL)
  - pre-β-lipoproteiny (VLDL)
  - α-lipoproteiny (HDL)
- ↓ směr dělení

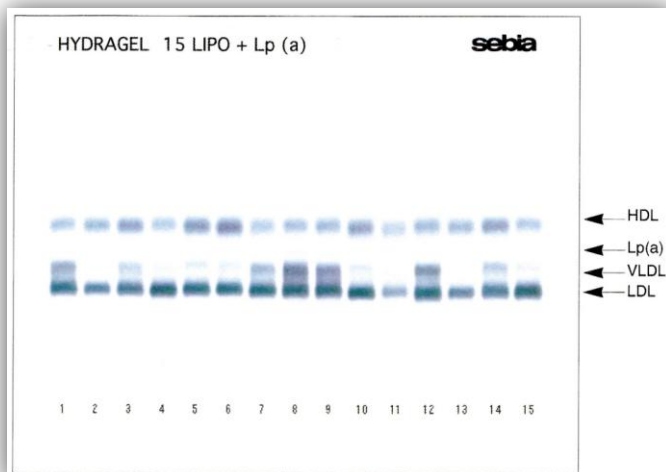
Na základě ultracentrifugace a tomu odpovídajícího elektroforetického dělení (sér pacientů s poruchami metabolismu lipidů), rozlišoval *Fredrickson* pět typů *hyperlipoproteinémií*. Jednotlivé třídy se lišily podle obsahu příslušných lipoproteinů. Toto dělení se dnes již neužívá, elektroforéza lipoproteinů se však stále běžně provádí.

#### Schéma elektroforézy lipoproteinů



#### Vysvětlivky a poznámky

..... představuje start dělení, případně na tomto místě zůstávají chylomikrony; **β**, **pre-β**, **α** jsou beta, pre-beta a alfa lipoproteiny (toto pojmenování je odvozeno právě z elektroforetické pohyblivosti: „alfa“ putují nejdál, před „beta“ jsou „pre-beta“). Charakter jednotlivých „čar“ na schématu naznačuje obrazec po výsledném barvení elektroforeogramu



Na obrázku vlevo je reálný elektroforeogram dělení lipoproteinů a Lp(a) na folii s agarosovým gelem *Hydragel 15 LIPO + Lp (a)* firmy Sebia

#### Lipoprotein (a)

se stanovuje elektroforeticky nebo imunochemicky.

Poloha frakce při elektroforetickém dělení je znázorněna na obrázku vlevo.

#### 14.5.4.1. Metody stanovení HDL-cholesterolu

HDL-cholesterol (HDL-C) je cholesterol nacházející se v HDL částicích. Stanovení cholesterolu bylo popsáno na začátku kapitoly. Problémem je, jak odlišit cholesterol právě v těchto částicích (totéž platí, jak uvidíme dále, pro cholesterol v částicích LDL). Hledaly se různé cesty jak jednotlivé frakce lipoproteinů oddělit, či vyloučit nebo separovat, aby stanovený cholesterol pocházel právě z těchto částic. V rutinní praxi zvítězily *přímé metody stanovení HDL cholesterolu*. Podobně existují metody pro stanovení cholesterolu v LDL částicích. Pro stanovení cholesterolu v částicích VLDL zatím metody nemáme.

##### Precipitační frakcionace

Pro oddělení frakce s HDL-cholesterolem se používají různá *srážecí činidla*, nejčastěji je používán roztok chloridu hořečnatého a kyseliny fosfowolframové. Po centrifugaci je HDL-cholesterol obsažen v supernatantu (nad sraženinou částic LDL a VLDL – viz dále), kde se stanoví buď neenzymově, nebo enzymově; dalším srážedlem jen např. směs dextransulfátu, heparinu s manganatými ionty a PEG 6000 a další

##### Elektroforetické stanovení

HDL je v  $\alpha_1$ -frakci; kvantifikace je možná při použití enzymových reagensů (cholesterolesteráza, cholesterol oxidáza, peroxidáza), případně kombinace cholesterolreduktázy s nitrotetrazoliovou modří (NBT); metoda poskytuje informace i o přítomnosti abnormálních lipoproteinů, např. Lp(a)

##### Gradientová gelová elektroforéza (GGE)

tj. ELFO v gradientovém polyakrylamidovém gelu, dělení probíhá podle velikosti částic

##### Kapilární izotachoforéza

Dělení se děje podle efektivní pohyblivosti částic mezi vedoucím a koncovým elektrolytem

##### Vysokoučinná gelová chromatografie (HPGC)

dělení podle velikosti částic v gelově permeačních kolonách

##### Imunochemická separace

dělení podle různého obsahu apolipoproteinů za použití protilátek proti apoA-I, apoA-II a apoE; používá se imunoafinitní chromatografie nebo imunoelektroforetické techniky

##### Ultracentrifugace v hustotním gradientu

dělení podle rozdílů v hustotě lipoproteinů

#### Homogenní metody (přímé metody)

Existuje celá řada metod, které lze seřadit podle různých principů. Existuje jistě i jiné dělení než dále uvedené, ale můžeme uvést, jako velmi jednoduché, např. toto rozdělení metod:

- metody *blokové*
- metody *imunoinhibiční*
- metody *eliminační*.

V principu se vždy jedná o to, nějakým způsobem *zabránit reagování cholesterolu obsaženého v jiných frakcích, než je frakce HDL* (čili ve frakcích *non-HDL*), s činidlem pro stanovení cholesterolu. Podle způsobu provedení této zábrany, se metoda jmenuje.

- **Blokové metody** (princip: *maskování non-HDL*, tj. všech tříd lipoproteinů kromě HDL, blokovacím činidlem)
  - LDL, VLDL a CHM vytvoří s blokovacím činidlem komplexy neschopné reakce s enzymovým činidlem; to reaguje pouze s cholesterolem obsaženým v HDL  
*Výrobci souprav: Roche (HDL-C Plus Assay), Sentinel, Dialab*
  - blokové činidlo se adsorbuje na povrch LDL, VLDL a chylomikronů a převede je na rozpustné komplexy odolné denaturaci; naopak HDL se zdenaturuje a cholesterol uvolněný z HDL se enzymaticky stanoví  
*Výrobci souprav: Dajichi Pure Chemicals Company, Japonsko; Genzyme Corporation, Cambridge, Velká Británie*
- **Imunoinhibiční metody** (princip: *maskování non-HDL pomocí specifické protilátky*)
  - za použití činidla obsahujícího protilátku proti apoB a apoC-III dojde k tvorbě komplexů všech tříd lipoproteinů kromě HDL; potom se enzymaticky stanoví cholesterol v HDL  
*Výrobci souprav: International Reagent Corporation, Japonsko (IRC)*
  - činidlo s obsahem protilátek proti lidským  $\beta$ -lipoproteinům vytvoří s non-HDL LP rozpustné komplexy, které nereagují s enzymatickým činidlem; s tím naopak reaguje cholesterol obsažený v HDL (tzv. *imunoseparační metoda*)  
*Výrobci souprav: Wako Pure Chemical Industry, Japonsko*

- **Eliminační metoda** (princip: postup zahrnující *odstranění non-HDL* a v nich obsaženého cholesterolu)
  - Pufr o specifické iontové síle rozruší non-HDL, cholesterol v nich obsažený je enzymaticky pozměněn a uvolněný peroxid vodíku rozložen katalázou; v dalším kroku dojde k inhibici katalázy azidem sodným, k rozpuštění HDL-cholesterolu v detergentu a jeho následnému enzymatickému stanovení

*Výrobci souprav: Denka Seiken Co., Japonsko; Randox Laboratories Limited, Velká Británie*

### Souhrn

- non-HDL vytvoří s blokovacím činidlem (blokovací metody) nebo s protilátkami (imunoinhibiční metody) nerozpustné nebo rozpustné komplexy (v nich obsažený cholesterol *nereaguje*) a enzymaticky se stanoví cholesterol v HDL
- non-HDL se rozruší pufrem, non-HDL cholesterol je pozměněn a enzymaticky se stanoví cholesterol v HDL (eliminační metoda)

Principy metod u dvou konkrétních diagnostických souprav od dvou výrobců

- **Diagnostická souprava firmy Sentinel, HDL Cholesterol, Direct Liquid D.P.R.**, využívá ve vhodném prostředí (pufru a tzv. tenzidů – povrchově aktivních látek – se specifickou afinitou k jednotlivým třídám lipoproteinů) sérii enzymatických reakcí k eliminaci cholesterolu v částicích LDL a VLDL a další sérii enzymatických reakcí k převedení HDL-cholesterolu na chinonové barvivo, jehož intenzita zbarvení se fotometruje (*eliminační metoda*); fotometrie při 600 nm
- **Diagnostická souprava firmy PLIVA-Lachema Diagnostika, HDL Cholesterol Direct Liquid 80**, používá protilátku proti lidským lipoproteinům, která reaguje se všemi lipoproteiny kromě HDL. Vzniklé imunokomplexy nemohou reagovat v následné reakci využívající cholesteroloxidázu a peroxidázu (viz enzymové stanovení cholesterolu) a reaguje pouze cholesterol v HDL částicích. Vzniklý peroxid vodíku reaguje v pozměněné Trinderově reakci na modré barvivo, které se fotometruje při 593 nm (*imunoseparační metoda*)

### Referenční metody

využívají kombinace ultracentrifugace, selektivní precipitace a stanovení cholesterolu s využitím *Abellovy-Kendallov* metody (viz *Cholesterol*)

Hodnoticí meze:	Dolní mez [mmol/l]	Horní mez mmol/l]
Muži	1,00	2,10
Ženy	1,20	2,70

Kromě absolutní hodnoty je důležitý i vztah k ostatním běžně stanovovaným lipidům (cholesterolu a TG) a relativní obsah HDL-cholesterolu v celkovém cholesterolu. Obecně platí – čím vyšší podíl HDL-cholesterolu a čím méně celkového cholesterolu, tím lépe. Vychází se z toho, že HDL částice plní roli „odklížeče“ cholesterolu (buňky obsahující přebytek cholesterolu mohou HDL částicím nadbytečný cholesterol odevzdat).

#### 14.5.4.2. Metody stanovení LDL-cholesterolu

LDL-cholesterol (LDL-C) je cholesterol nacházející se v LDL částicích. Vše, co bylo řečeno o stanovení HDL cholesterolu, platí prakticky i pro stanovení LDL cholesterolu, kromě výpočtu, který metody stanovení oproti stanovení HDL cholesterolu rozšiřuje.

##### Výpočet koncentrace LDL-C

Friedewald, W.T. (1972):  $LDL-C = \text{cholesterol} - (TG \times f)$  [mmol/l], kde  $f = VLDL-C/VLDL-TG = 0,45$

Jiná forma této rovnice:  $LDL-C = \text{cholesterol} - ((TG/2,2) + HDL-C)$

**Podmínka platnosti výpočtu:** triacylglyceroly < 5,6 mmol/l

Existuje několik možností výpočtu, což jsou modifikace původního *Friedewaldova* vzorce, které zahrnují hladinu celkového cholesterolu, HDL-cholesterolu a triacylglycerolů. Výpočty jsou více či méně ovlivněny hypertriacylglycerolémií.

##### Ultracentrifugační separace lipoproteinů

Rozdělení/separace lipoproteinů v solném gradientu na základě jejich flotace (viz tabulka na str. 2).

Neužívá se rutinně (v běžné praxi zdravotnické laboratoře).

**Vysokoučinná gelová chromatografie (HPGC)**

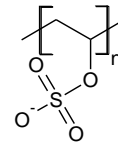
Principem je dělení na základě velikosti molekul, na výstupu kolony je spřažená enzymatická reakce s fotometrií při 550 nm; výhodou je stanovení LDL-C bez Lp(a)

**Precipitace sulfatovanými polyanionty**

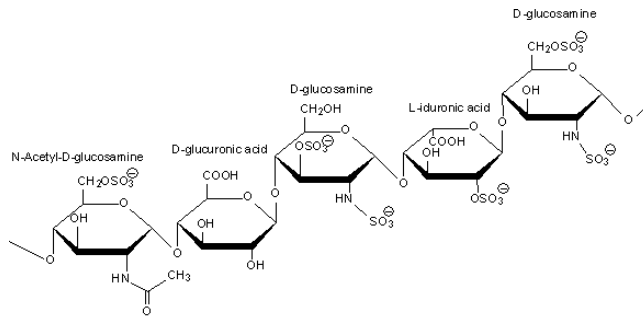
Principem je selektivní precipitace HDL-C látkami jako jsou dextran, polyvinylsulfát, heparin)

**Příklady použití u některých výrobců dg. souprav:**

- heparin v citrátovém pufru (Merck)
- polyvinylsulfát v přítomnosti EDTA a polyetylen glykolmetyléru (ROCHE)



Obecný vzorec polyvinylsulfátu



**Heparin** je glykosaminoglykan (GAG), Tyto GAG představují komplex heterogenních směsí opakujících se disacharidových jednotek složených z *uronových kyselin* (kyseliny D-glukuronová nebo L-iduronová) a D-glukosaminu nebo N-acetyl-D-glukosaminu. Každá monosacharidová jednotka může být sulfatována, přičemž stupeň sulfatace je různý – od žádné sulfátové skupiny na monosacharidu po tři skupiny na jednom monosacharidu.

**Elektroforetické stanovení LDL-C**

Principem je separace lipoproteinů v agarosovém gelu v barbitolovém pufru o pH 8,6, s enzymatickým vybarvením frakcí.

**Imunoseparační metoda**

Principem je selektivní imunoprecipitace VLDL, IDL a HDL pomocí polystyrenových latexových částic s navázanými polyklonálními protilátkami proti apoA-I a apoE. Precipitované částice se zachytí na filtru, LDL a Lp(a) zůstávají ve filtrátu a v nich obsažený cholesterol se enzymaticky měří.

**Homogenní (přímé) metody**

(srovnej též stanovení HDL-C)

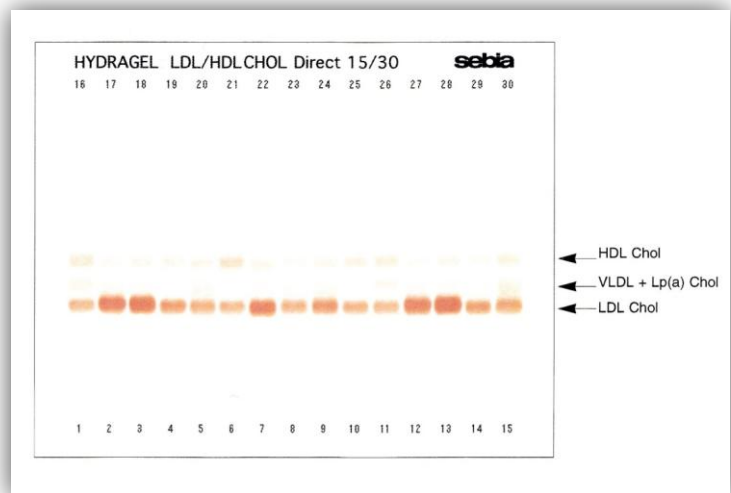
- **Metody využívající polyétery v kombinaci se sulfatovanými cyklohextriny:** non-LDL vytvoří neprecipitující komplexy s  $\alpha$ -cyklohextrinsulfátem, cholesterol v těchto komplexech enzymatické reakci nepodléhá; pomocí neionogenního detergentu se rozpustí LDL a cholesterol v nich obsažený se stanoví enzymaticky (blokační metoda)

Výrobci souprav: Kyowa Medex, Japonsko; Roche

- **Eliminační metoda (detergent assay):** činidlo obsahující kombinaci polyaniontu a amfoterního detergentu *rozruší non-LDL částice* a rozpuštěný cholesterol je enzymaticky pozměněn za tvorby peroxidu, který je rozložen katalázou; v dalším kroku se přidá reagensie s neionogenním detergentem, dojde ke zrušení "blokovaní" LDL a k rozpuštění LDL-cholesterolu, který se stanoví enzymaticky

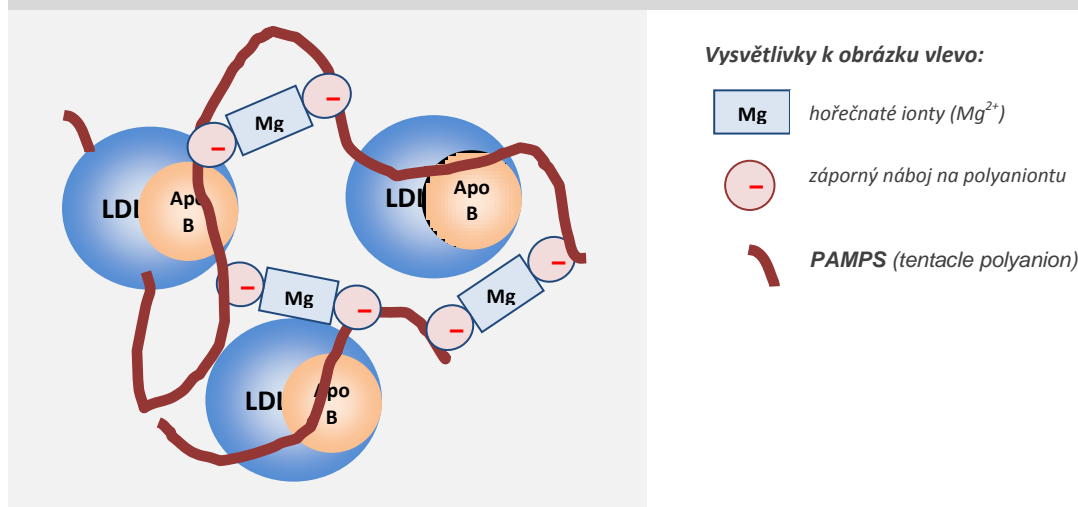
Výrobci (dodavatelé) souprav: Wako, Randox, BioVendor, PLIVA-Lachema Diagnostika aj.

- **Homogenní zákalová metoda (turbidimetrie):** non-LDL částice jsou zamaskovány dipolárním detergentem, současně je jim tak také zabráněno tvořit komplexy. Po přidání směsi pufru/polyanion/detergent/ $Mg^{2+}$  vytvoří LDL částice s polyaniontem (který má tvar vlákna, nazývá se *tentacle*, což doslova přeloženo znamená *chapadlo*) specifické komplexy, které jsou zesíťovány pomocí hořčičnatých kationtů (polyanion omotá LDL částice a mezi vlákny i v samotném vláknu se vytvoří můstky pomocí  $Mg^{2+}$ ). Vzniklá turbidita se měří fotometricky.



Elektroforeogram dělení cholesterolu na foliích s agarosovým gelem Hydragel LDL/HDLCHOLDirect 15/30 fy Sebia

## Schéma tvorby specifického komplexu LDL částic s polyanionem a hořečnatými ionty



**Poznámka:** tentacle („chapadlový“) polyanion = PAMPS, tj. kyselina poly-(2-akrylamido-2-methyl-1-propansulfononová)

## Referenční metoda

Referenční metodou je tzv. *beta-kvantifikace*, která kombinuje ultracentrifugaci, precipitaci (heparin +  $MgCl_2$ ) a referenční metodu stanovení cholesterolu podle *Abella-Kendalla*.

Z metod nejvíce používaný *výpočet* je v poslední době postupně nahrazován přímým stanovením LDL-C (homogenní metody).

## Hodnoticí meze:

Dolní mez:	Horní mez:
1,20 mmol/l	3,00 mmol/l

Obecně platí, že hodnota LDL-cholesterolu by měla být co nejnižší. Vychází se z toho, že LDL částice transportují cholesterol do tkání (srovnej schéma metabolismu lipoproteinů).

## 14.5.4.3. Klinické poznámky

Hladina cholesterolu v séru vykazuje pozitivní korelaci s výskytem aterosklerózy a koronárním srdečním onemocněním. Totéž však platí i o triacylglycerolech. U pacientů s cévními chorobami mohou být zvýšeny VLDL (hladina LDL normální), LDL (hladina VLDL normální), LDL i VLDL. *Diabetes mellitus*, *lipoidní nefróza*, *hypotyroidismus* a jiné stavy hyperlipidémie, tj. choroby s dlouhodobě zvýšenými hladinami VLDL, IDL nebo LDL jsou často provázeny předčasnou nebo velmi závažnou aterosklerózou. Nízká hladina krevního cholesterolu je typická pro hypertyreoidismus.

Dojde-li k poruše rovnováhy mezi rychlostí tvorby triacylglycerolů a jejich degradací či odsunem, může dojít ke ztuhnutí jater. Příčinou mohou být *stoupající hladina volných mastných kyselin v plazmě* (mobilizace tuku v tukové tkáni, hydrolýza lipoproteinů, hydrolýza triacylglycerolů v chylomikronech, potrava s vysokým obsahem tuku, hladovění) nebo *metabolický blok produkce plazmatických lipoproteinů* (zablokování syntézy apolipoproteinů, zastavení syntézy lipoproteinu z lipidu a apolipoproteinu, nedostatek fosfolipidů, které jsou součástí lipoproteinů, špatný sekreční mechanismus). Syntézu apolipoproteinů mohou blokovat i např. některá antibiotika (*puromycin*), ale také tetrachlormetan, chloroform, fosfor, arsen, olovo a jiné látky.

## Pro zvědavé studenty. Pro snižování sérového cholesterolu mají význam

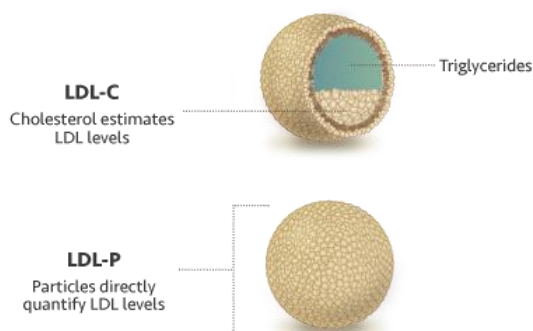
- *změna stravy*; jedná se zejména o náhradu některých nasycených mastných kyselin *polyenovými mastnými kyselinami a mastnými kyselinami s jednou nenasycenou vazbou*, tedy o zařazení přirozeně se vyskytujících olejů s polyenovými mastnými kyselinami (slunečnicový, kukuřičný, sójový) či olejů s mastnými kyselinami s jednou nenasycenou vazbou (olivový) do jídelníčku. Podstata účinku těchto kyselin není známa, předpokládá se účinek na metabolismus (zrychlení katabolismu LDL) prostřednictvím ovlivnění LDL- receptoru aj.
- *způsob života*; hladina cholesterolu je ovlivňována hladinou mastných kyselin, které zase reagují např. na nikotin (kouření), psychické stresy, fyzickou inaktivitu apod.
- *léčba* (nepomohou-li předchozí dvě aktivity). Zde se zasahuje do metabolismu cholesterolu např. cholestyraminovou pryskyřicí (Questran), která přerušuje enterohepatální oběh žlučových kyselin (tyto produkty



degradace cholesterolu se nevyloučí stolicí zcela, ale část se vrací enterohepatálním oběhem do jater a zpětnou vazbou snižují přeměnu cholesterolu na žlučové kyseliny; po přerušení tohoto působení pryskyřici nebo chirurgicky, probíhá přeměna cholesterolu na žlučové kyseliny zvýšenou měrou). Resorpci z gastrointestinálního traktu může snižovat sitosterol, rostlinný sterol. Některá léčiva působí na různých úrovních biosyntézy cholesterolu jako inhibitory (mevastatin a lovastatin z hub). Klofibrát a gemfibrozil ovlivňují sekreci VLDL z jater.

**Nejnovější technikou pro stanovení lipoproteinů je nukleárně magnetická rezonanční spektroskopie** NMR-spektroskopii (*Nuclear Magnetic Resonance Spektroskopie*; viz str. 11-32), k tomuto účelu poprvé použil v devadesátých letech minulého století James D. Otvos, Ph.D., profesor biochemie, který touto technikou studoval proteiny. Vyvinul techniku, kterou se dají relativně levně stanovit přímo lipoproteinové částice, zejména LDL. Vzhledem k tomu, že aterogenní jsou primárně právě tyto částice, konkrétně apoproteiny, nikoliv samotný cholesterol (ten případně až následně po oxidaci), je to přímá cesta zjištění kardiovaskulárního rizika, přesnější a správnější než měření prostřednictvím cholesterolu.

**Komerční test fy LipoScience, Inc.:** NMR LipoProfile® test pro stanovení LDL-P (LDL- částic, P = *particle*, částice)



**Vysvětlení nesouhlasu mezi stanovením LDL částic prostřednictvím cholesterolu (LDL-C) a NMR-spektroskopií, která stanovuje přímo LDL částice (LDL-P)**

Obsah cholesterolu v lipoproteinových částicích přirozeně kolísá, proto zjištěné hodnoty LDL-C a LDL-P jsou velmi často v zájmném rozporu. Z klinického hlediska, tzn. z hlediska správného stanovení kardiovaskulárního rizika a následně adekvátní léčby, je vhodnější stanovení LDL-P. Může se totiž stát, že hladina LDL-C bude hodnocena jako příznivá, přitom skutečný obsah částic, čili LDL-P, bude v oblasti zvýšeného rizika kardiovaskulárního onemocnění.

**LDL-C:** Cholesterol estimates LDL levels = odhad hladiny LDL na základě stanovení cholesterolu

**LDL-P:** Particles directly quantify LDL levels = přímá kvantifikace hladiny LDL zjištěním počtu částic

Na principu NMR-spektroskopie pracuje automatický analyzátor [Vantera® Clinical Analyzer](#), který identifikuje a kvantifikuje lipoproteinové částice (viz str. 11-32).

## 14.6. Co jsou to lipidové indexy

Posuzování hladiny celkového cholesterolu nestačí, vždy je nutno sledovat i ostatní parametry, tj. hladinu triacylglycerolů a HDL a LDL cholesterolu. Využívají se i tzv. *lipidové indexy*

### Poměr [cholesterol] / [HDL-C]

Tento ukazatel vyjadřuje podíl HDL cholesterolu k cholesterolu ve všech lipoproteinech (zejména v LDL). U mužů má mít tento poměr hodnotu menší jak 5,0 (lépe pod 4,5), u žen má mít hodnotu pod 4,0 (lépe pod 3,5). Někdy je tento poměr definován opačně, tj. [HDL cholesterol] / [cholesterol], hodnota pak v podstatě vyjadřuje procentový (jednicový) obsah HDL cholesterolu v celkovém cholesterolu: muži by měli mít alespoň 20% HDL cholesterolu z celkového obsahu cholesterolu, ženy alespoň 25%

### Aterogenní index (KLIMOV) = (cholesterol - HDL-C) / HDL-C

Hodnotící meze: 1 - 4,5

Hodnoty mezi 4 - 5 tvoří tzv. šedou zónu, hodnoty nad 5 jsou výrazně patologické.

Podmínka platnosti výpočtu: cholesterol > 0,8 mmol/l ; HDL cholesterol > 0 mmol/l

### Poměr LDL / HDL = LDL-C / HDL-C

Hodnotící meze: 1 - 3 (v podstatě doplněk, koreluje s Klimovem)

### Poměr TG / HDL = triacylglyceroly / HDL-C

Hodnotící meze: 0,5 - 2,5 (nový index, nepřináší nové informace)

### Poměr apoA-I / apoB = apolipoprotein A-I / apolipoprotein B

Hodnotící meze: 1,4 - 1,6 (platí obecná zásada - čím vyšší hodnota poměru, tím lepší); někdy se používá tento poměr opačný, pak platí i opačné hodnocení.

### Body Mass Index

(BMI) = hmotnost [kg] / povrch těla [m<sup>2</sup>]

#### Hodnotící meze:

BMI > 25 nadváha

BMI > 30 obezita

#### Nověji:

muži BMI > 28 obezita

ženy BMI > 27 obezita

## 14.7. Poruchy metabolismu lipidů se týkají transportu nebo ukládání lipidů

Poruchy metabolismu lipidů (lipoproteinů) se týkají *transportu lipidů* (dyslipoproteinémie) nebo ukládání lipidů v buňkách (sfgolipidózy).

### 14.7.1. Poruchy transportu lipidů

Poruchy metabolismu lipidů, *dyslipoproteinémie (DLP)*, patří mezi nejčastěji se vyskytující metabolické poruchy v populaci. Jsou jednou z příčin kardiovaskulárních onemocnění, především ischemické choroby srdeční. Dyslipoproteinémie představuje celou řadu poruch metabolismu lipidů, které mohou mít mnoho příčin. Na jejím vzniku se prakticky vždy podílí nejméně dva faktory – genetické a zevního prostředí (kouření, fyzická inaktivita, strava). Jsou charakterizovány změnami v koncentracích cirkulujících lipoproteinů. Jedná se o specializovanou a složitou problematiku, takže v tomto textu se omezíme pouze na informace dostatečné pro základní, v podstatě laickou, orientaci v dané oblasti. Prvním laboratorním nálezem u dyslipoproteinemii je nejčastěji zvýšená hladina cholesterolu a/nebo triacylglycerolů a/nebo zvýšená či snížená koncentrace HDL cholesterolu. Zvýšení hladiny LDL cholesterolu a triacylglycerolů a snížená hladina HDL cholesterolu jsou nezávislými rizikovými faktory pro vznik ischemické choroby srdeční.

Obecně platí, že pro prevenci ischemické choroby srdeční je žádoucí, aby byla hladina

- celkového cholesterolu < 5,0 mmol/l
- LDL cholesterolu < 3,0 mmol/l
- triacylglycerolů < 2,0 mmol/l
- HDL cholesterolu > 1,0 mmol/l a
- poměr cholesterol/HDL-C < 5

*Přesnější hodnotící meze jsou uvedeny v textu a shrnuty jsou v následující tabulce.*

**Poznámka:** Ve skutečnosti jsou průměrné hodnoty v české populaci jiné - průměrné hodnoty cholesterolu jsou u mužů cca 5,9 mmol/l a u žen cca 5,8 mmol/l a koncentrace LDL zhruba 3,8 mmol/l u mužů a 3,7 mmol/l u žen.

### Společné doporučení České společnosti klinické biochemie ČLS JEP a České společnosti pro aterosklerózu ČLS JEP ke sjednocení hodnotících mezí krevních lipidů a lipoproteinů pro dospělé populaci ([odkaz](#))

Analyt	jednotka	dolní mez	horní mez
Celkový cholesterol	(mmol/l)	2,90	5,00
LDL cholesterol	(mmol/l)	1,20	3,00
HDL-cholesterol muži	(mmol/l)	1,00	2,10
HDL-cholesterol ženy	(mmol/l)	1,20	2,70
Triacylglyceroly	(mmol/l)	0,45	1,70
apolipoprotein B	(g/l)	0,5	1,00
apolipoprotein A 1 muži	(g/l)*	1,00 *	1,70 *
apolipoprotein A 1 ženy	(g/l)*	1,10 *	1,90 *

#### Legenda:

\*dolní a horní meze pro apolipoprotein A 1 nejsou hodnotami podle doporučení pro prevenci kardiovaskulárních onemocnění; pro tento analyt žádná doporučená hodnota neexistuje. Hodnoty uvedené v tabulce jsou hodnotami, které výbor ČSKB doporučuje uvádět na náleзовých listech.

Dyslipoproteinémie (DLP) můžeme dělit podle různých principů

- Podle jejich etiologie (příčiny), které jsou vrozené a sekundární
- Podle laboratorního nálezu, klasifikace Frederiksonova a klasifikace terapeutická

#### Vrozené DLP

Je popsáno několik desítek poruch v metabolismu lipidů; v ČR asi 2% populace s touto poruchou.

Dělí se na

- a) monogenní (způsobené mutací v jednom genu)
  - i) familiární hypercholesterolemie
  - ii) familiární defekt apoB<sub>100</sub>
  - iii) familiární hyperchylomikronemie
- b) polygenní (způsobené mutací ve více genech)
  - i) polygenní hypercholesterolemie
  - ii) polygenní familiární hypertriglyceridemie
  - iii) familiární kombinovaná hyperlipidemie

- iv) familiární dysbetalipoproteinemie
- v) vrozená hyperlipoproteinemie typu V

**Sekundární DLP** se mohou rozvíjet zevními příčinami a/nebo účinkem jiných akutních či chronických onemocnění

(endokrinní, diabetes mellitus, onemocnění jater, ledvin, akutní a chronická infekční onemocnění, obezita, poruchy příjmu potravy, ale i při fyziologických stavech (těhotenství), také účinkem léků a toxinů (i alkoholu).

#### DLP podle laboratorního nálezu

a. **Klasifikace Fredericksonova** (původní dělení dyslipoproteinemií, hyperlipoproteinemií). Klasifikace vycházela z Fredericksonova elektroforetického schématu (viz str. 11-18). Jedná se o tzv. „fenotypizační klasifikační schéma“:

- Typ I, primární hyperchylomikronémie (zvýšení chylomikronů)
- Typ IIa, primární hypercholesterolemie (zvýšení LDL)
- Typ IIb, primární kombinovaná hyperlipoproteinémie (zvýšení VLDL + LDL)
- Typ III, primární dysbetalipoproteinémie (zvýšení  $\beta$ -VLDL)
- Typ IV, primární hypertriacylglycerolemie (zvýšení VLDL)
- Typ V, primární kombinovaná hyperlipoproteinémie (zvýšení VLDL + chylomikronů)

Protože tato klasifikace neodpovídá zcela genotypu, tj. genetická porucha se může projevit různě, či dokonce v průběhu choroby může jeden fenotyp přecházet v druhý, byla tato typizace postupně opuštěna.

b. **Terapeutická klasifikace:** jak vyplývá z předchozího textu, dyslipoproteinémie jsou především **hyperlipidémie** (**hypolipidémie** jsou vzácné):

- **Hypercholesterolemie** (též **izolovaná hypercholesterolemie**): izolované zvýšení celkového cholesterolu, převážně v LDL
- **Kombinovaná hyperlipidémie**: současné zvýšení cholesterolu i triacylglycerolů
- **Hypertriacylglycerolemie=hypertriglyceridémie** (též izolovaná hypertriacylglycerolemie **případně** izolovaná hypertriglyceridémie): izolované zvýšení triacylglycerolů

**Základním laboratorním vyšetřením** je stanovení hladin celkového cholesterolu a triacylglycerolů.

Pro přesnější rozlišení poruchy

- se stanovují hladiny **cholesterolu v HDL a v LDL** (HDL-C a LDL-C,) **apoA-I** a **apoB100**, případně **dalších apolipoproteinů**
- může se provést **elektroforéza lipoproteinů**
- mohou se provést další **specializovaná vyšetření krevních lipidů**.

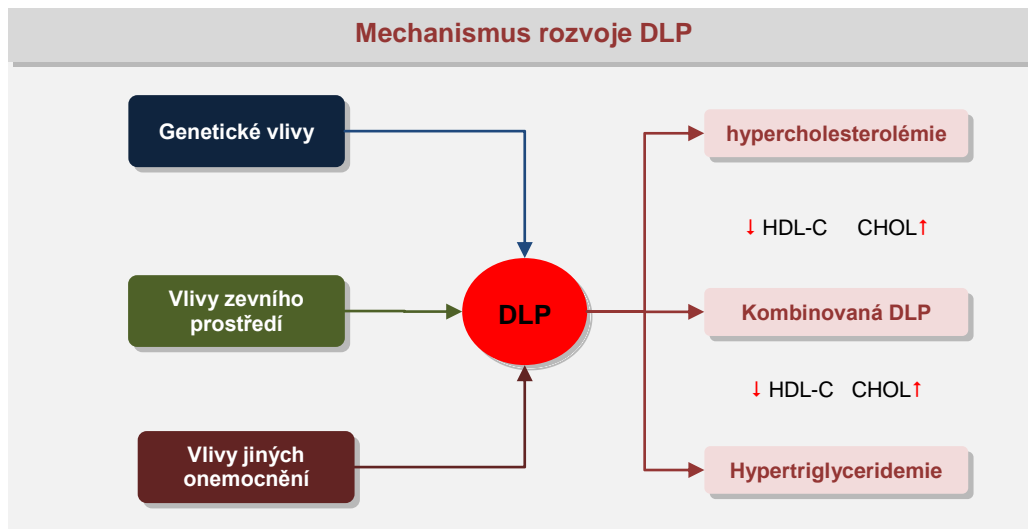
#### Specializovaná vyšetření krevních lipidů

Dostupná pouze na několika specializovaných pracovištích

- **Vyšetření DNA** metodami molekulární biologie (defekt genu pro apoB100 a defekt genu pro LDL receptor) pro upřesnění diagnostiky familiární hypercholesterolemie
- **Vyšetření apoE** (na **izoformy E2, E3, E4**) u dysbetalipoproteinemie
- **Vyšetření defektu lipoproteinové lipázy, jaterní lipázy, apoC-II, LCAT, CETP** pro potřeby diagnostiky některých vzácných poruch metabolismu lipidů
- **Vyšetření funkční aktivity LDL receptorů** (stupeň postižení LDL receptorů) u nemocných s familiární hypercholesterolemí

Vzhledem k závažnosti dopadů je sledování poruch metabolismu lipidů velmi důležité a je žádoucí, aby příslušná laboratoř dodávala relevantní výsledky analýz.

**Poznámka:** Nutno dodat, že názory mnohých odborníků se od uvedených (včetně „Doporučení“) diametrálně liší a za původce poruch lipidového metabolismu jsou považovány (velmi zjednodušeně řečeno) zejména „AGE’s“ (viz. [str.](#) 14-25 a 14-26 v kapitole 14) a cukr, jako takový.



#### Stanovení lipidů - prepreanalytická fáze:

Pacient před odběrem krve má být lačný po dobu 12 – 14 hodin, předchozí 2 – 3 dny má být vynechán alkohol. Před vlastním odběrem je nutná poloha v klidu v sedě po dobu nejméně 10 minut.

Vyšetření nemá být prováděno, když pacient

- nedodržel 2 týdny před odběrem krve svůj běžný životní styl
- nedávno proběhlo nebo je přítomno akutní či subakutní onemocnění
- je dekompenzovaný *diabetes mellitus*
- pacientka je těhotná nebo je v období do ½ roku po porodu.

Vyšetření u pacienta dosud neléčeného na dyslipoproteinémie musí být zopakováno v období 1 – 8 týdnů v téže laboratoři a pacient během této doby nesmí změnit své stravovací návyky a hmotnost.

### 14.7.2. Poruchy z ukládání lipidů

Poruchy z ukládání lipidů mají svůj původ v defektech buněčných enzymů zúčastněných v přeměnách lipidů. Dělí se na

- **metabolické poruchy katabolismu cholesterolu**
  - *Wolmanova choroba*, vzácná dědičná porucha metabolismu, při níž se ukládají estery cholesterolu a triacylglyceroly do buněk jater, ledvin, nadledvin, hematopoetického systému a do tenkého střeva
  - *Familiární deficit LCAT*, další vzácná dědičná porucha, v séru jsou zvýšeny triacylglyceroly, hladina cholesterolu je variabilní, chybí estery cholesterolu, lipidy se ukládají na rohovce, která je mléčně zakalena, v glomerulární membráně (dochází k proteinurii), v kostní dřeni a ve slezině (*sea blue histiocyty*), v erytrocytech (anémie), v cévní stěně (ateromy), dochází i ke změnám v plazmatických lipoproteinech (abnormální charakter elektroforézy lipoproteinů)
- **poruchy v přeměně sfingolipidů – sfingolipidózy.**

Jedná se o skupinu dědičných poruch sfingolipidů, (membránových lipidů). Tyto lipidy se hromadí v různých orgánech. Jména chorob jsou podle ukládajícího se lipidu (gangliozydóza, glukocerebrozydóza, galaktosylceramidóza, ceramidtrihexosidóza, sfingomyelinóza, ceramidóza), případně podle autora, který ji první popsal (glukocerebrozydóza – Gaucherova choroba, ceramidtrihexosidóza – Fabryho choroba apod.). Tyto choroby se vyskytují většinou v několika formách, prakticky vždy vedou k mentální retardaci, degeneraci nervového systému, poškození zraku a dalším závažným defektům.

## 14.8. Klíčovou úlohu v ateroskleróze hraje zánět

Na rozdíl od skutečné infekce, kde zánět pomáhá odrazit invazi mikroorganismů, v tomto případě působí škodlivě (podobně jako např. u revmatoidní artritidy a jiných chorob zánětlivého původu).

### Souhrn

- **Ateroskleróza** = nebezpečné hromadění tukovitých depozit (plátů) v tepnách. Tento děj je podporován zánětem.
- Zánět je i příčinou toho, že některé pláty pukají: na povrchu rozpadlých plátů dochází k torbě krevních sraženin, které mohou artérie ucpávat a vést tak k srdečnímu infarktu nebo mozkové mrtvici
- Nadbytek LDL může ve stěnách tepen spouštět zánětlivou reakci. Tlumení této reakce léky je podstatou současné léčby aterosklerózy. Současně se hledají cesty, jak zabránit zánětu jiným způsobem
- Kromě stanovení cholesterolu se hledají další testy popisující stav aterosklerózy (např. stanovení hladiny CRP)

**Markerem nestability aterogenního plátu** je především *myeloperoxidáza (MPO)*, lyzozomální enzym ze skupiny peroxidáz, přítomný v primárních (azurofilních) granulích leukocytů (podrobnosti viz např. [zde](#)).

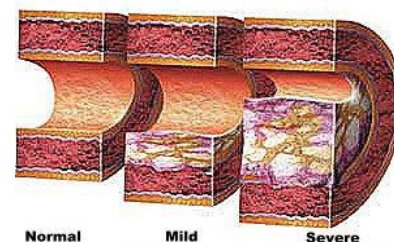
### Pro zvědavé studenty.

#### Vznik plátu v cévní stěně

Tukovitá depozita čili pláty vznikají v cévní stěně. Cévní stěnu tvoří tři vrstvy:

- *Intima*, která je tvořena především endotelovými buňkami vystýlajícími cévy. Tyto buňky jsou uloženy na tenké vrstvě mezibuněčné hmoty (matrix) řídkého vaziva protkaného tu a tam málo diferencovanými elementy hladkého svalstva (produkují matrix)
- *Media*, obsahuje zejména buňky hladké svaloviny
- *Adventia*, což je vnější vrstva cévy.

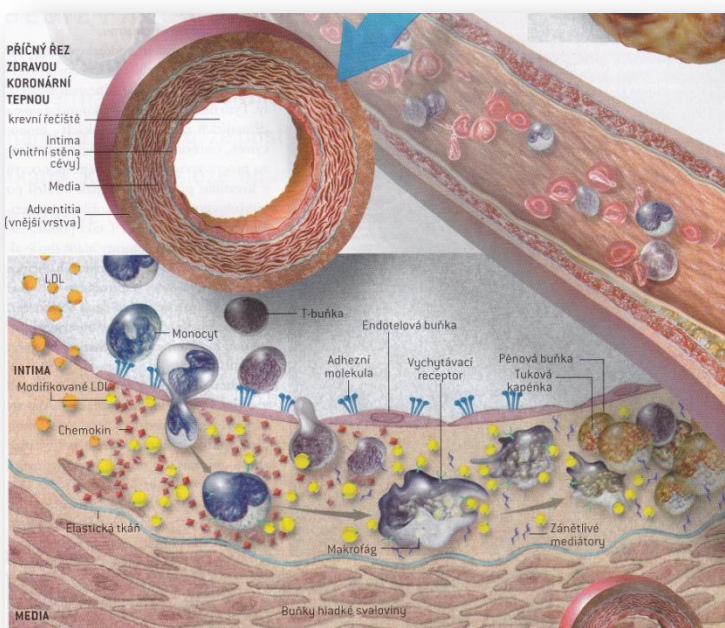
Při normálních koncentracích LDL-cholesterolu v krvi, může LDL-cholesterol volně přecházet do intimy i z ní volně odcházet. Je-li LDL-cholesterolu v krvi nadbytek, začne se v mezibuněčné hmotě intimy hromadit. Lipidy v LDL částici postupně začnou podléhat oxidaci, mění se jejich struktura. Současně dochází ke glykosylaci bílkovinné složky LDL (významné zejména u diabetiků). Buňky cévní stěny vnímají tyto změny jako *podnět k aktivaci obranného systému organismu*.



normální arterie střední ateroskleróza těžká ateroskleróza

#### Postupně dochází k těmto dějům

- Na svém povrchu obráceném do krevního řečiště začnou buňky cévní stěny vystavovat *adhezivní molekuly*, které ulpívají na *monocytech*. Díky tomu monocyty vypadávají z krevního proudu, koulejí se po vnitřním povrchu cévy, až přilnou k arteriální stěně.
- Endotelové buňky a elementy hladkého svalstva intimy začnou produkovat *chemokiny*, které přitahují monocyty a způsobí, že monocyty začnou pronikat do intimy
- Chemokiny a ostatní látky vznikající v endotelu v buňkách hladkého svalstva přimějí monocyty k dělení a *diferenciaci v aktivní makrofágy*. Makrofágy se na svém povrchu vybaví speciálními receptory a s jejich pomocí začnou čistit cévní stěnu a pohlcují pozměněné částice LDL. Výsledkem je makrofág přeplněný tukovými kapénkami – *pěnová buňka* (viz též str. 11-15)
- Působením adhezivních molekul a chemokinů pronikají do intimy i *T-lymfocyty*, které uvolňují *cytokiny* (přenášejí signál mezi buňkami imunitního systému a organizují jejich činnost), jež *posilují zánětlivou reakci*



Vznik plátu

tepenné stěny.

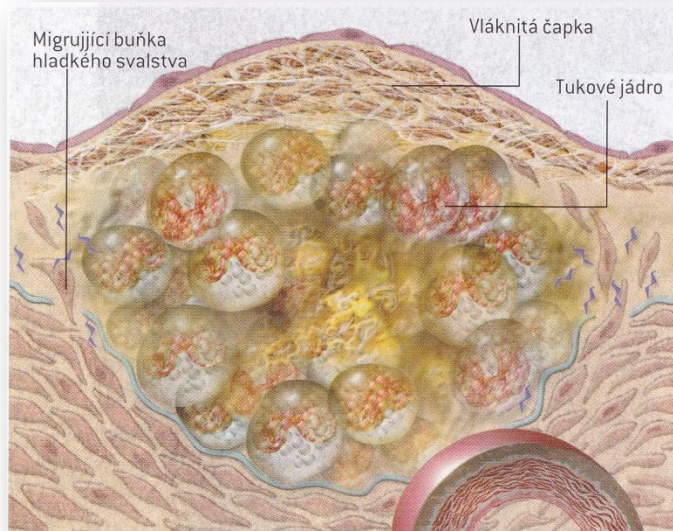
- Kombinací pěnových buněk s menším počtem T-lymfocytů vznikají tzv. *tukové proužky*, předchůdci komplexních plátů, které posléze deformují artérie.

#### Progrese plátu

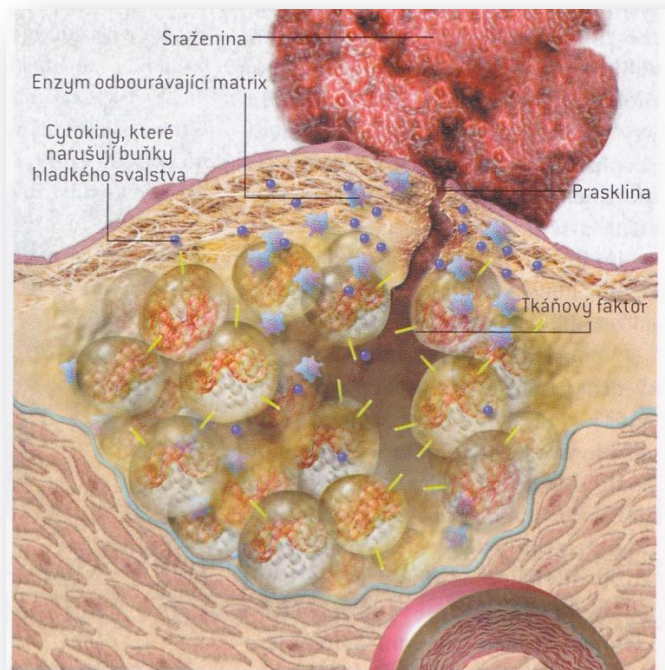
- Zánětlivé molekuly mohou iniciovat další růst plátu a *utváření vláknité čapky* nad lipidovým jádrem. V podstatě se jedná o hojivý proces. Buňky hladké svaloviny medie migrují na povrch intimy, kde se množí a produkují tuhou vláknitou (kolagenovou) matrix, která drží buňky pohromadě. Čapka zvětšuje plát, ale současně ho bezpečně odděluje od krve.

#### Prasknutí plátu

- Zánětlivé látky vylučované pěnovými buňkami mohou zeslabit čapku natrávením molekul matrix a ohrožením buněk hladké svaloviny, které potom nejsou schopny čapku opravit. Na zánětlivých procesech uvnitř artérií se mohou podílet i některé viry a bakterie (herpetické viry, *Chlamydia pneumoniae*), snad i vzdálená infekce. Narušení plátu vlivem zánětu je proces velmi rychlý, trvá nejdéle dva dny. Pěnové buňky mohou na svém povrchu vystavit *tkáňový faktor*, který je mocným *iniciátorem srážení*. Děje se tak např. působením T-buněk (na plátu) na makrofágy, které pak vytvářejí vysoké hladiny tohoto faktoru. Při případném prasknutí plátu dojde k tvorbě sraženiny (trombu), která může zastavit tok krve v artérii a způsobit infarkt nebo mrtvici.



Progrese plátu



Prasknutí plátu

#### Kladná úloha HDL lipoproteinů v ateroskleróze

(podrobněji viz úvodní články této kapitoly o apolipoproteinech, lipoproteinech a jejich metabolismu)

- Brání oxidaci LDL, protože mohou přepravovat antioxidační enzymy schopné odbourávat oxidované lipidy. Tím se potlačuje zánět.
- Dopravují cholesterol do jater za účelem odstranění nebo recyklace.

#### Pouze asi 15% infarktů je způsobeno ucpáním cévy plátem.

V ostatních případech rostou pláty spíše dovnitř cévní stěny a příčinou infarktu je vznik trombu popsany výš v textu. Potlačení zánětu např. aspirinem má kladný vliv na potlačení rizika vzniku AIM. Hodnota CRP může napovídat o probíhajícím zánětu v organismu a o výši rizika AIM i při normální hladině cholesterolu. Pláty, které vyčnívají do tepenného lumen způsobují anginu pectoris, tj. pocity tísně, bolesti nebo tlaku, obvykle pod hrudní kostí, zvl. při zvýšených nárocích na dodávku krve (námaha, stres). Pláty, které nevyčnívají do prostoru cévy, ale jsou uvnitř stěny, jsou při prasknutí příčinou nečekaného infarktu, bez předchozích varování (jako je tomu např. u anginy pectoris). Dále jsou příčinou toho, že léčebné postupy zaměřené na rozšíření cévního průsvitu (balónová angioplastika, zasouvání drátěných klecových stentů) nebo chirurgicky vytvořený bypass sice omezí bolesti na hrudníku, ale často nezabrání dalšímu infarktu. Ošetřené arterie se často brzy znovu ucpávají – zřejmě následkem silného zánětu, který může vzplanout po léčebném zákroku.

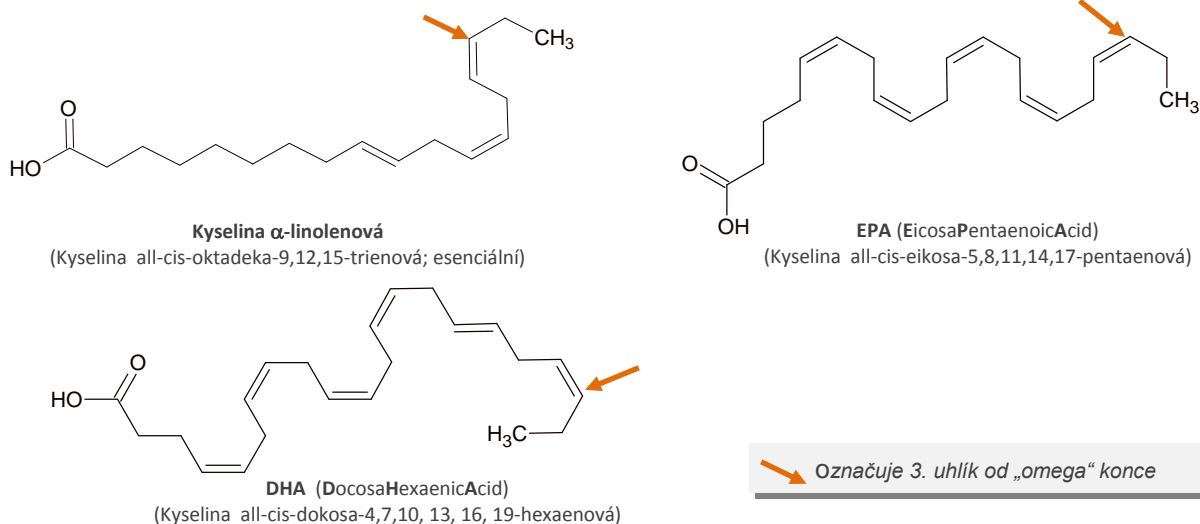
Peter Libby, *Ateroskleróza: Nový pohled*, Scientific American, české vydání, květen 2002 str. 29 – 37

## 14.9. Několik slov o polyenových mastných kyselinách

Na závěr ještě několik slov pro zvědavé studenty o určitých nenasycených mastných kyselinách, diskutovaných zvláště v souvislosti s předchozím tématem. Jedná se o tzv.  $\omega$ -3 (neboli  $n$ -3) a  $\omega$ -6 (neboli  $n$ -6) nenasycené mastné kyseliny,  $\omega$  se nazývá poslední uhlík v mastné kyselině (srovnej též s výkladem na str. 11-21).

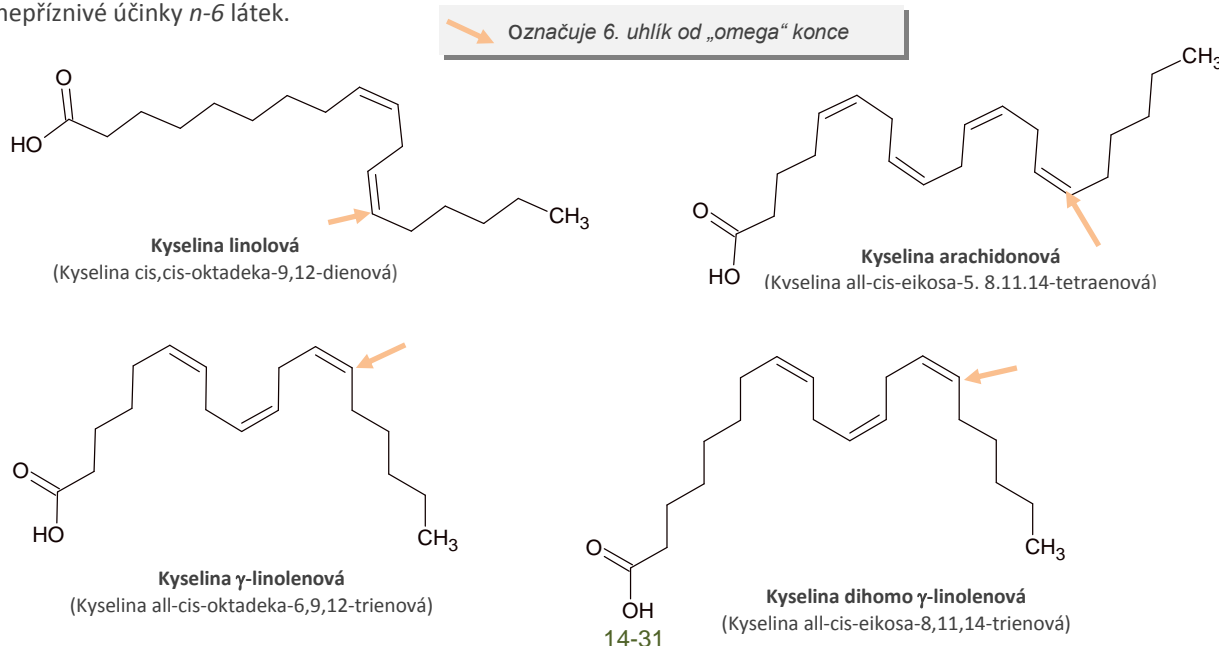
### 14.9.1. Omega-3-nenasycené mastné kyseliny ( $n$ -3 kyseliny)

mají nejvzdálenější dvojnou vazbu na třetím uhlíku od koncové (tj. „omega“) methylové skupiny. Vyskytují se v tuku mořských živočichů a některých rostlinných olejích. Tyto mastné kyseliny mohou modulovat složení leukotrienů (hormony lipidové povahy odvozené od kyseliny arachidonové, se třemi dvojnými vazbami, stimulují uvolňování prostaglandinů), ovlivňovat syntézu prostaglandinů, inhibovat agregaci destiček a zvyšovat poměr HD k LD lipoproteinům, zatímco obecná hladina lipidů (zvláště triglyceridů) klesá. Existují důkazy, že mohou inhibovat některé typy rakoviny.



### 14.9.2. Omega-6 nenasycené mastné kyseliny ( $n$ -6 kyseliny)

mají nejvzdálenější dvojnou vazbu na šestém uhlíku od koncové methylové skupiny. Vyskytují se převážně v rostlinných olejích a olejích ze semen. Některé lékařské výzkumy svědčí o tom, že vysoký poměr hladin  $n$ -6 mastných kyselin vzhledem k  $n$ -3 mastným kyselinám může zvyšovat pravděpodobnost výskytu různých chorob a depresí (nepříznivé působení při ateroskleróze, astma, artritidě, cévních chorobách, trombóze, imunitně-zánětlivých onemocněních, při růstu nádorů). Vedou se diskuse o tom, jaký poměr těchto kyselin je „ideální“. Faktem je, že s postupem času se v lidském jídelníčku prosazují více  $n$ -6 mastné kyseliny, na úkor kyselin  $n$ -3. Některé názory tvrdí, že není třeba se starat o hladinu  $n$ -6 kyselin, ale stačí zajistit vysokou koncentraci  $n$ -3 kyselin. Z pozitivních účinků se uvádí např. působení tkáňové kyseliny arachidonové, která konvertuje na  $n$ -6 prostaglandiny a  $n$ -6 leukotrienové hormony a tím vytváří značný počet cílů na které se mohou zaměřit účinky léčiv a takto se minimalizují jinak nepříznivé účinky  $n$ -6 látek.



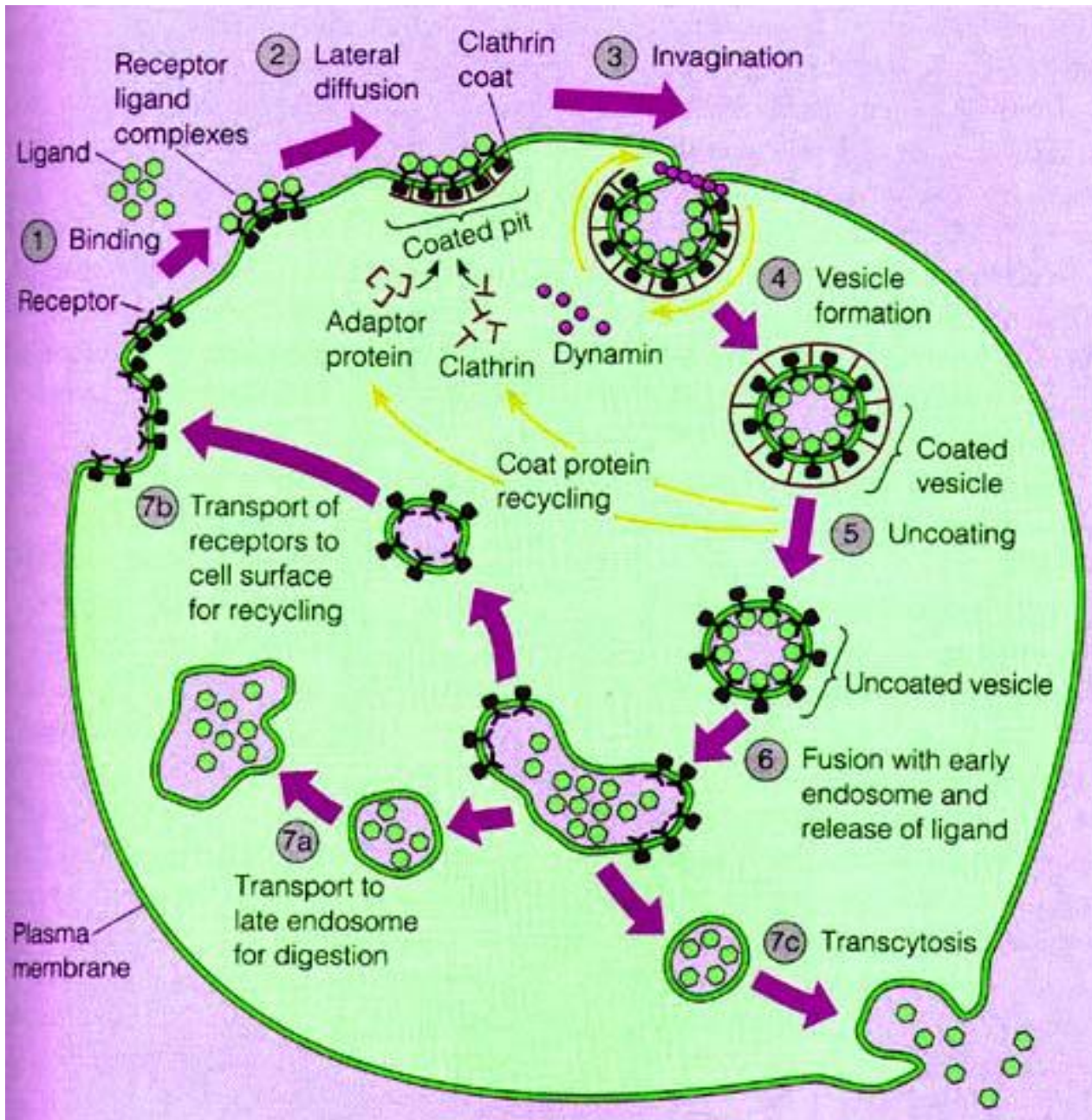
## 14.10. Dodatky

### 14.10.1. Coated pits čili potažené jamky

Na obrázku je znázorněna *receptory zprostředkovaná endocytóza*, se kterou jsme se již setkali při výkladu o metabolismu železa. Obrázek je dostatečně názorný k pochopení pojmu *coated pits* (potažené jamky).

**Vysvětlivka:** Klathrin (*clathrin*) je bílkovina, která se zúčastňuje tvorby váčků při receptorem zprostředkované endocytóze.

Ilustrační obrázek k pojmu *coated pits*



Receptory zprostředkovaná endocytóza



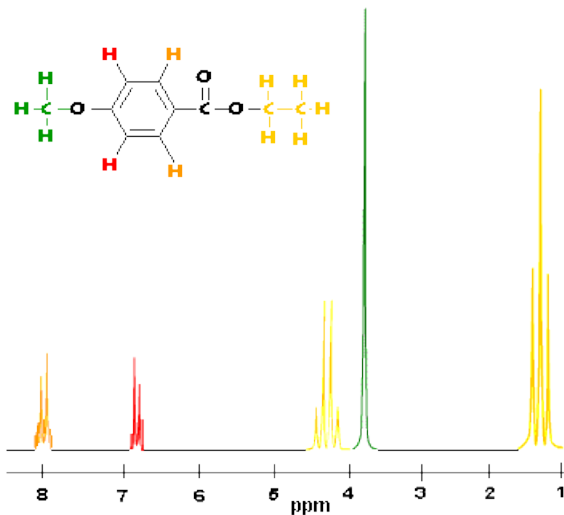
## 14.10.2. NMR-spektroskopie

### Nukleární magnetická rezonanční spektroskopie

*Nukleární magnetická rezonanční spektroskopie* patří mezi analytické optické metody založené na absorpci elektromagnetického záření. Jádra některých atomů mohou, díky svému magnetickému momentu, absorbovat v silném magnetickém poli elektromagnetické záření, odpovídající vlnovou délkou rádiovým vlnám (kmitočet 60 – 1000 MHz). Absorpční maxima v příslušném spektru informují o struktuře zkoumané sloučeniny. Obecně podává NMR spektroskopie komplexní informace o vnitřní struktuře a uspořádání hmoty.

Působením magnetického pole na atom se mění energetická hodnota tzv. *jaderného spinu*. Dojde k rozštěpení jednotné hladiny energie spinů na dvě, nižší a vyšší. Při ozáření atomů s takto rozdělenými spiny radiofrekvenčním zářením může dojít k absorpci tohoto záření a přechodu jednotlivých spinů na vyšší hladinu.

NMR spektroskopie se v chemii využívá ke studiu nízkomolekulárních látek i k objasňování struktury velkých molekul, např. bílkovin a nukleových kyselin, své uplatnění našla i ve farmacii a v potravinářském průmyslu. V lékařství je hojně využívána zobrazovací technika založená na nukleárně magnetické rezonanci známá jako *magnetická rezonance*, resp. jako MRI (*magnetic resonance imaging*) v anglosaském světě. V poslední době našla analytická metoda založená na nukleární magnetické rezonanci své místo i v klinické laboratorní analytice (identifikace a kvantifikace lipoproteinových částic).



Ukázka NMR spektra a naznačení identifikace atomů a skupin



Stolní přístroj Pulsar (OXFORD Instruments)



Stolní přístroj Fourier 60, vhodný pro výuku (BRUKER)



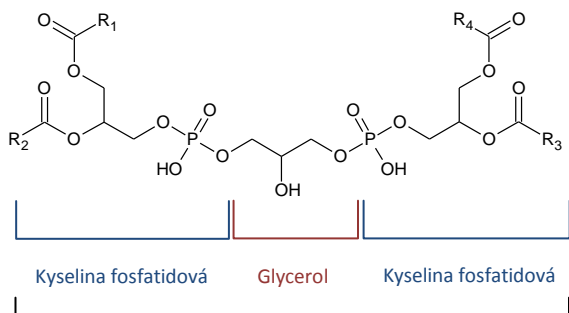
Vantera<sup>®</sup> Clinical Analyzer (LIPOSCIENCE)



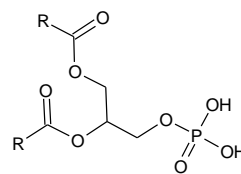
NMR spektrometr INCA od fy Bruker

### 11.10.3. Kardiolipin

Esterifikací glycerolfosfátu dvěma mastnými kyselinami s dlouhými řetězci vzniká *kyselina fosfatidová* (viz také kapitola 15, [str.](#) 15-18). Esterifikací glycerolu dvěma fosfatidovými kyselinami vzniká složený lipid *difosfatidylglycerol* (*glycerofosfolipid*), zvaný *kardiolipin*. Ten je důležitou součástí vnitřní mitochondriální membrány.



Kardiolipin; 1,3-bis(sn-3'-fosfatidyl)sn-glycerol

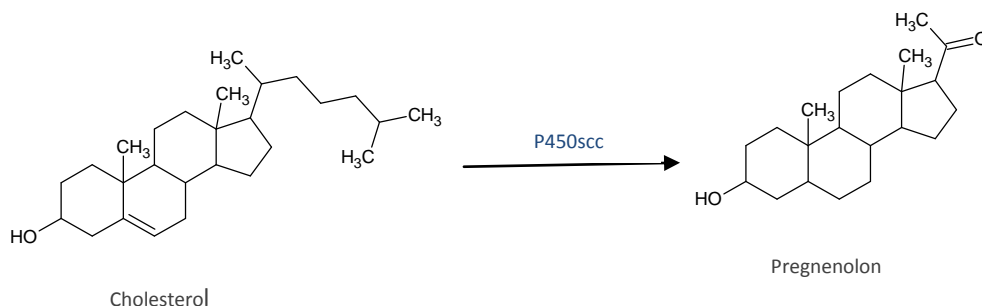


Kyselina fosfatidová

U savců mají většinou mastné kyseliny v kardiolipinu 18 uhlíků s dvěma nenasycenými vazbami v každé z nich. Předpokládá se, že tato struktura, tzn. 18 uhlíků a 2 dvojně vazby ve 4 acylových řetězcích, podmiňuje vysokou afinitu kardiolipinu k proteinům vnitřní mitochondriální membrány savců.

#### Kardiolipin je poměrně činný:

- jako lapač elektronů se zúčastňuje oxidační fosforylace
- přechodem do vnější mitochondriální membrány spouští apoptózu
- přenáší cholesterol z vnější do vnitřní mitochondriální membrány
- aktivuje tzv. *P450<sub>scc</sub>*, což je enzym, který aktivuje konverzi cholesterolu na pregnenolon (srovnej reakci dole a schéma v kapitole 14, na [str.](#) 14-34)
- jako aktivátor mitochondriálního rýhování
- při přenosu proteinů do mitochondriální matrix
- má antikoagulační funkci.



*P450<sub>scc</sub>* je jiné označení pro *cholesterol side-chain cleavage* (akronymem druhé části názvu je „*scc*“), celý název naznačuje, že enzym je členem superrodiny cytochromu P450.

#### Klinický význam má kardiolipin

- u vzácného genetického onemocnění známého jako *Barthův syndrom*, kde je postižena biosyntéza kardiolipinu, což vede ke snížené produkci ATP a v důsledku ke kardiomyopatii a všeobecné slabosti postiženého jedince
- u Parkinsonovy a pravděpodobně i Alzheimerovy choroby, kde jsou pozorovány nižší koncentrace kardiolipinu, což je provázáno vyšším stresem z volných radikálů
- u nealkoholického tukového postižení jater (*NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease*) a u srdečního selhání (*HF, heart failure*), úloha kardiolipinu v těchto případech je však zatím nejasná a předmětem diskuse
- u *Tangierovy choroby*, charakterizované nízkými hodnotami plazmatického HDL-cholesterolu; na rozdíl od Barthova syndromu, je u Tangierovy choroby syntéza kardiolipinu zvýrazněna (3 – 5x vyšší hladiny)
- u diabetu v raných stádiích jsou pozorovány nižší hladiny kardiolipinu, což vede ke kardiovaskulárním komplikacím
- u syfilidy, kdy se ve *Wassermannově testu na syfilidu* používá jako antigen kardiolipin z hovězího srdce (reagují však i jiné protilátky, včetně *systémového lupus erythematosus*, malarie a tuberkulózy), takže test není specifický
- u HIV-1, nádorových bujení (rakovin) a u antifosfolipidového syndromu.

**O antifosfolipidovém syndromu se hovoří u pacientů s antikardiolipinovými protilátkami**

Ty mohou být infekčního původu (syfilis) nebo autoimunního (sklerosa, lupus). Pacienti mohou mít opakované trombotické příhody, často i v období středních až pozdních „teenagerských“ let. Tromby se mohou objevovat i v cévách, ve kterých je trombóza poměrně neobvyklá, např. v jaterních či ledvinových.

Antikardiolipinové protilátky jsou často zvýšeny u mladých žen s opakovanými spontánními aborty. Příčinou může být mutace v Apo-H, jehož jednou funkcí je i vazba kardiolipinu.

### 14.11. Stručné shrnutí kapitoly

- Lipidy jsou různorodé látky, jejichž společným jmenovatelem je nerozpustnost ve vodě a rozpustnost v tzv. tukových rozpouštědlech.
- Většinu lipidů tvoří estery mastných kyselin s glycerolem nebo se sfingosinem, mnoho s nich obsahuje dále různé cukry, kyselinu fosforečnou, případně i další složky, jakými jsou etanolamin, cholin, serin, kyselina sírová, étery aj.
- Tělesné tuky (estery mastných kyselin s glycerolem) pocházejí z potravy, kdy ovšem prošly chemickou úpravou v organismu a z vlastní biosyntézy ze sacharidů a proteinů.
- Lipidy jsou pro organismus významné jako zdroj (i zásobní) energie, jako strukturní součásti membrán, jako izolační prvek a cholesterol jako prekurzor steroidních hormonů.
- Z klinicko-biochemického hlediska mají význam především cholesterol, triacylglyceroly, mastné kyseliny, fosfolipidy a sfingolipidy. Z hlediska rutinní laboratorní praxe pak zejména cholesterol a triacylglyceroly, jejichž stanovení se provádí denně ve významných množstvích.
- Metody stanovení cholesterolu a triacylglycerolů v moderním provedení používají specifické enzymy, vyústěním reakce je modifikovaná Trinderova reakce.
- Pro pohyb ve vodném prostředí (zejména krve a lymfy) využívají lipidy proteinové nosiče, apoproteiny (apolipoproteiny), se kterými tvoří lipoproteiny. Apoproteiny tvoří třídy značené velkými písmeny abecedy, případně další dělení využívá římské a arabské číslice.
- Apoproteiny mají několik důležitých funkcí: transport lipidů (jako strukturální součást amfipatických lipoproteinů), vazba na specifické receptory, kofaktory lipolytických enzymů (některé apoproteiny).
- Existuje polymorfismus některých apoproteinů, výsledkem je různá afinita produktu alely k receptoru rezultující v poruchu metabolismu lipidů.
- Různé třídy apoproteinů jsou typické pro různé třídy lipoproteinů. Apoproteiny jsou většinou při metabolismu lipoproteinů směnitelné, kromě apoB.
- Apolipoproteiny se stanovují pomocí specifických protilátek.
- Lipoproteiny se dělí do skupin na základě ultracentrifugace v hustotním gradientu (chylomikrony, VLDL, LDL, HDL) nebo elektroforetického dělení (chylomikrony,  $\beta$ -lipoproteiny, pre- $\beta$ -lipoproteiny,  $\alpha$ -lipoproteiny)
- Metabolismus lipoproteinů je komplikovaný. Prvotní formou vstřebaných lipidů (zejména tuků) jsou chylomikrony, které postupně odevzdávají tkáním triacylglyceroly a částicím HDL cholesterol, estery cholesterolu a fosfolipidy. Chylomikronové zbytky končí převážně v játrech. Zde dochází k syntéze tuků tělu vlastních, které ve formě VLDL opouštějí játra a výměnou apolipoproteinů i lipidového obsahu postupně přecházejí na IDL a LDL. Prostředníkem v těchto dějích jsou částice HDL. V principu HDL „odklízí“ z buněk a LDL „přiváží“ do buněk, zejména cholesterol. LDL mohou vstoupit do jater a tam být degradovány. Důležitou roli v odklizení zbytků hrají i makrofágy a speciální bílkovinné molekuly, patřící do tzv. ABC superrodiny membránových transportérů-přenašečů. V celém metabolismu se uplatňuje i řada enzymů, jejichž postižení může podstatně metabolismus lipidů ovlivnit.
- Různé lipoproteiny mají různou afinitu k cévnímu endotelu, podle toho vykazují různou aterogenitu, čili riziko ohrožení aterosklerózou. Nejvyšší aterogenitu vykazuje lipoprotein(a).
- Metody stanovení lipoproteinů jsou ultracentrifugace v hustotním gradientu, elektroforéza lipoproteinů a imunochemické metody.
- Imunochemické metody se využívají ke stanovení HDL a LDL cholesterolu, přičemž moderní metody jsou homogenní (přímé), nevyžadující žádné separace či oddělené kroky analýzy a jsou snadno proveditelné na biochemických analyzátoch. Fungují na různých principech, kdy cíl je vždy stejný – zamezit reakci non-HDL, resp. non-LDL částic. K tomu se využívají zejména blokovací činidla (blokační metody), protilátky (imunoinhibiční metody) nebo rozrušení non-částic specifickou reagentií (eliminace metody).
- Moderní metodou je stanovení LDL-částic (partikulí) nukleárně magnetickou rezonanční spektrometrií.
- Poruchy metabolismu lipidů se týkají transportu lipidů (dyslipoproteinémie) nebo ukládání lipidů (sfingolipidózy).
- Dyslipoproteinémie patří mezi nejčastěji se vyskytující metabolické poruchy v populaci, jsou jednou z příčin kardiovaskulárních onemocnění. Je to skupina poruch metabolismu lipidů, na jejichž vzniku se vždy podílí nejméně dva faktory - genetické a zevního prostředí. Jsou charakterizovány změnami v koncentracích cirkulujících lipoproteinů. Dělí se podle příčiny (vrozené a sekundární) a podle

laboratorního nálezu (zastaralá Fredericksonova klasifikace, moderní terapeutická klasifikace).

- Poruchy z ukládání lipidů mají svůj původ v defektech buněčných enzymů zúčastněných v přeměnách lipidů a dělí se na metabolické poruchy katabolismu cholesterolu (Wolmanova choroba, familiární deficit LCAT) a na poruchy v přeměně sfingolipidů, sfingolipidózy. Názvy chorob jsou podle ukládajícího se lipidu (gangliozidóza, glukocerebrozidózy, sfingomyelinóza, ceramidóza aj.) nebo podle autora, který ji první popsal (Gaucherova choroba, Fabryho choroba apod.).
- Vyšetření krevních lipidů vyžaduje speciální přípravu (preanalytickou fázi), zahrnující hladovění vyšetřované osoby po určitou dobu a vystříhání se některých činností a potravin.
- Při poruchách metabolismu lipidů se mohou kromě základních stanovení (celkový cholesterol, HDL a LDL cholesterol, případně apoA-I a apoB100) provádět i specializovaná vyšetření krevních lipidů, většinou dostupná pouze na specializovaných pracovištích (DNA metody pro odkrytí defektu příslušných genů, vyšetření izoform apoE, vyšetření defektu příslušných enzymů a proteinových přenašečů, vyšetření funkční aktivity LDL receptorů aj.).
- Aterosklerózou se rozumí nebezpečné hromadění tukovitých depozit (plátů) v tepnách. Tento děj je podporován zánětem. Zánět může spouštět např. nadbytek LDL částic ve stěnách tepen. O probíhajícím zánětu informuje stanovení CRP. Pokud je plát vytvořen, lze stupeň jeho nestability zjistit stanovením myeloperoxidázy (MPO).
- Existuje Společné doporučení České společnosti klinické biochemie ČLS JEP a České společnosti pro aterosklerózu ČLS JEP ke sjednocení hodnotících mezí krevních lipidů a lipoproteinů pro dospělé populaci, kde jsou (mimo jiné) uvedeny i tzv. „hodnotící meze“, jakési „cílové hodnoty“ pro krevní lipidy. Má se za to, že nepřekročení těchto mezí snižuje ohrožení organismu aterosklerózou.
- Nejdůležitější hodnotící meze:
 

Celkový cholesterol	(mmol/l)	2,90	5,00
LDL cholesterol	(mmol/l)	1,20	3,00
HDL-cholesterol muži	(mmol/l)	1,00	2,10
HDL-cholesterol ženy	(mmol/l)	1,20	2,70
Triacylglyceroly	(mmol/l)	0,45	1,70
- Moderní názory myšlenky na původ aterosklerózy poněkud upravují. Zpochybňují např. úlohu cholesterolu v procesu aterosklerózy (netýká se nadbytečného zoxidovaného cholesterolu při poruchách lipidového metabolismu), uvádí se, že vyšší hodnoty sérového cholesterolu v seniorském věku korelují se zachováním lepších kognitivních schopností, se zábranou demence apod. Tyto názory je ještě potřeba potvrdit nebo vyvrátit.

## 14.12. Kontrolní otázky

1. Jaká společná vlastnost sdružuje „lipidy“ do této skupiny?
2. Jak se lipidy dopravují v krevní plasmě?
3. Co jsou to apo(lipo)proteiny, jak se rozdělují? K čemu slouží? Liší se jejich složení podle původu částic (např. podle původu triglyceridů)? Jak se označují třídy apoproteinů?
4. Co je to lipoprotein? Znáte názvy skupin lipoproteinů a původ těchto názvů (zkratk)?
5. Jaký je význam lipoproteinových receptorů? Jaké mají funkce?
6. Chápete alespoň rámcově metabolismus lipoproteinů? Dochází během metabolismu lipoproteinů k výměnám apoproteinů? Všech?
7. Je HDL uniformní, jednotná skupina lipoproteinů? Z čeho se HDL částice skládají? Jakou mají HDL částice fyziologickou funkci?
8. Jak byste stanovili jednotlivé apo(lipo)proteiny?
9. Víte jak se rozdělují lipoproteiny v homogenním stejnosměrném elektrickém poli? Jaký je vztah výsledku tohoto dělení k dělení lipoproteinů ultracentrifugací v hustotním gradientu?
10. Jak se stanovuje celkový cholesterol?
11. Jaký je rozdíl mezi celkovým, HDL a LDL cholesterolem? Tušíte jejich fyziologickou funkci?
12. Chápete obecný princip přímého stanovení HDL a LDL cholesterolu? Jakou roli v tom hrají metody na stanovení celkového cholesterolu?
13. Nebylo by lepší vymyslet metodu na úplné odstranění cholesterolu z organismu (než na jeho snižování)? Každou odpověď zdůvodněte.
14. Co jsou to triacylglyceroly? Jakou mají fyziologickou funkci? Kde se skladují?
15. Co víte o tukové tkáni?
16. Jak se stanovují triacylglyceroly?
17. Co jsou to „omega 3“ a „omega 6“ kyseliny?
18. Víte co jsou to dyslipoproteinemie? Jak se rozdělují? Jak vznikají? Jaké jsou jejich důsledky? Jak a kde se vyšetřují? Co z toho můžete vyšetřit v „běžné“ klinicko-biochemické laboratoři? Jakými metodami?
19. Existují i jiné choroby s původem v tukovém metabolismu?
20. Dokážete rozdělit lipidy do jednotlivých skupin? Jak se tyto skupiny jmenují? Jaké mají společné znaky? Zopakujte si co jsou to estery, co je to glycerol, sfingosin...

Užitečné adresy:

<http://erkki.kennesaw.edu/schem220/lipoprotein.gif>

<http://search.live.com/images/results.aspx?q=lipoprotein&FORM=BIRE#>

[Vybrané obrázky](#)

## OBSAH:

Kapitola 14 Lipidy .....	14-1
14.1. Cholesterol je živočišný sterol.....	14-2
14.1.1. Metody stanovení cholesterolu .....	14-3
Neenzymové metody stanovení cholesterolu a jejich principy.....	14-3
Referenční metoda pro stanovení celkového cholesterolu .....	14-3
Princip enzymových metod stanovení cholesterolu .....	14-4
14.2. Triacylglyceroly jsou estery glycerolu a mastných kyselin.....	14-4
14.2.1. Metody stanovení triacylglycerolů .....	14-5
14.3. Volné mastné kyseliny .....	14-6
14.4. Fosfolipidy jsou estery mastných kyselin se sfingosinem nebo s glycerolem .....	14-7
14.5. Všechny plazmatické lipidy se vážou na bílkoviny .....	14-7
14.5.1. Apoproteiny a jejich základní charakteristiky.....	14-9
14.5.1.1. Metody stanovení apolipoproteinů .....	14-10
14.5.2. Lipoproteiny a jejich základní charakteristiky .....	14-11
14.5.3. Metabolismus lipoproteinů je komplikovaný .....	14-11
HDL představuje velmi heterogenní populaci lipoproteinů.....	14-15
Lipoprotein(a), Lp(a), obsahuje apoprotein(a).....	14-17
14.5.4. Metody stanovení lipoproteinů.....	14-20
Ultracentrifugace .....	14-20
Elektroforetické dělení.....	14-20
14.5.4.1. Metody stanovení HDL-cholesterolu .....	14-21
Precipitační frakcionace .....	14-21
Elektroforetické stanovení.....	14-21
Gradientová gelová elektroforéza (GGE).....	14-21
Kapilární izotachoforéza.....	14-21
Vysokoučinná gelová chromatografie (HPGC) .....	14-21
Imunochemická separace .....	14-21
Ultracentrifugace v hustotním gradientu .....	14-21
Homogenní metody (přímé metody).....	14-21
Referenční metody .....	14-22
14.5.4.2. Metody stanovení LDL-cholesterolu.....	14-22
Výpočet koncentrace LDL-C .....	14-22
Ultracentrifugační separace lipoproteinů .....	14-22
Vysokoučinná gelová chromatografie (HPGC) .....	14-23
Precipitace sulfatovanými polyanionty .....	14-23
Elektroforetické stanovení LDL-C .....	14-23
Imunoseparační metoda .....	14-23
Referenční metoda .....	14-24
14.5.4.3. Klinické poznámky.....	14-24
Nejnovější technikou pro stanovení lipoproteinů je NMRS .....	14-25
14.6. Co jsou to lipidové indexy .....	14-25
Aterogenní index (KLIMOV) = (cholesterol – HDL-C) / HDL-C.....	14-25
Poměr LDL / HDL = LDL-C / HDL-C .....	14-25
Poměr TG / HDL = triacylglyceroly / HDL-C .....	14-25
Poměr apoA-I / apoB = apolipoprotein A-I / apolipoprotein B.....	14-25
14.7. Poruchy metabolismu lipidů se týkají transportu nebo ukládání lipidů .....	14-26
14.7.1. Poruchy transportu lipidů .....	14-26
Specializovaná vyšetření krevních lipidů.....	14-27
14.7.2. Poruchy z ukládání lipidů.....	14-28
14.8. Klíčovou úlohu v ateroskleróze hraje zánět .....	14-29
14.9. Několik slov o polyenových mastných kyselinách .....	14-31
14.9.1. Omega-3-nenasycené mastné kyseliny (n-3 kyseliny).....	14-31
14.9.2. Omega-6 nenasycené mastné kyseliny (n-6 kyseliny) .....	14-31
14.10. Dodatky .....	14-32
14.10.1. Coated pits čili potažené jamky .....	14-32
14.10.2. NMR-spektroskopie .....	14-33
11.10.3. Kardiolipin .....	14-34
14.11. Stručné shrnutí kapitoly .....	14-36
14.12. Kontrolní otázky .....	14-38