

# **Lipidy**

# **Lipoproteiny**

# **Apolipoproteiny**

**Petr Breinek**

# Lipidy

Lipos = tuk

- **Význam lipidů v organismu**

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

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

3) Biokatalyzátory, hormony

4) izolační vrstva, ochrana orgánů

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

# Transport lipidů

## ■ Krev a lymfatický systém

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

**lipidy + apolipoproteiny = lipoproteiny**

## ■ Zásobní lipidy a v buněčných membránách

# Odběr krve

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

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

Jaký je stav standardizace metod?

# Referenční metody

<b>Cholesterol</b>	<b>ID-GC/MS</b> <b>ID-LC/MS</b>
<b>Triacylglyceroly</b>	<b>ID-GC/MS</b>
<b>HDL cholesterol</b>	<b>UC a kvantifikace (CDC)</b>
<b>LDL cholesterol</b>	<b>UC a kvantifikace (CDC)</b>

# Referenční metody

ApoAI	není definována
ApoB	není definována
Lp(a)	není definována

# **CRM** (Certifikovaný referenční materiál)

<b>Cholesterol</b>	<b>SRM 909b NIST</b> <b>SRM 911b NIST</b> <b>NIST/SRM 1952a (USA)</b>
<b>Triacylglyceroly</b>	<b>SRM 909b</b> <b>NIST/SRM 1951a (USA)</b>
<b>HDL cholesterol</b>	<b>SRM 911a NIST</b> <b>NIST/SRM 1952a (USA)</b>
<b>LDL cholesterol</b>	<b>SRM 911a NIST</b> <b>NIST/SRM 1952a (USA)</b>

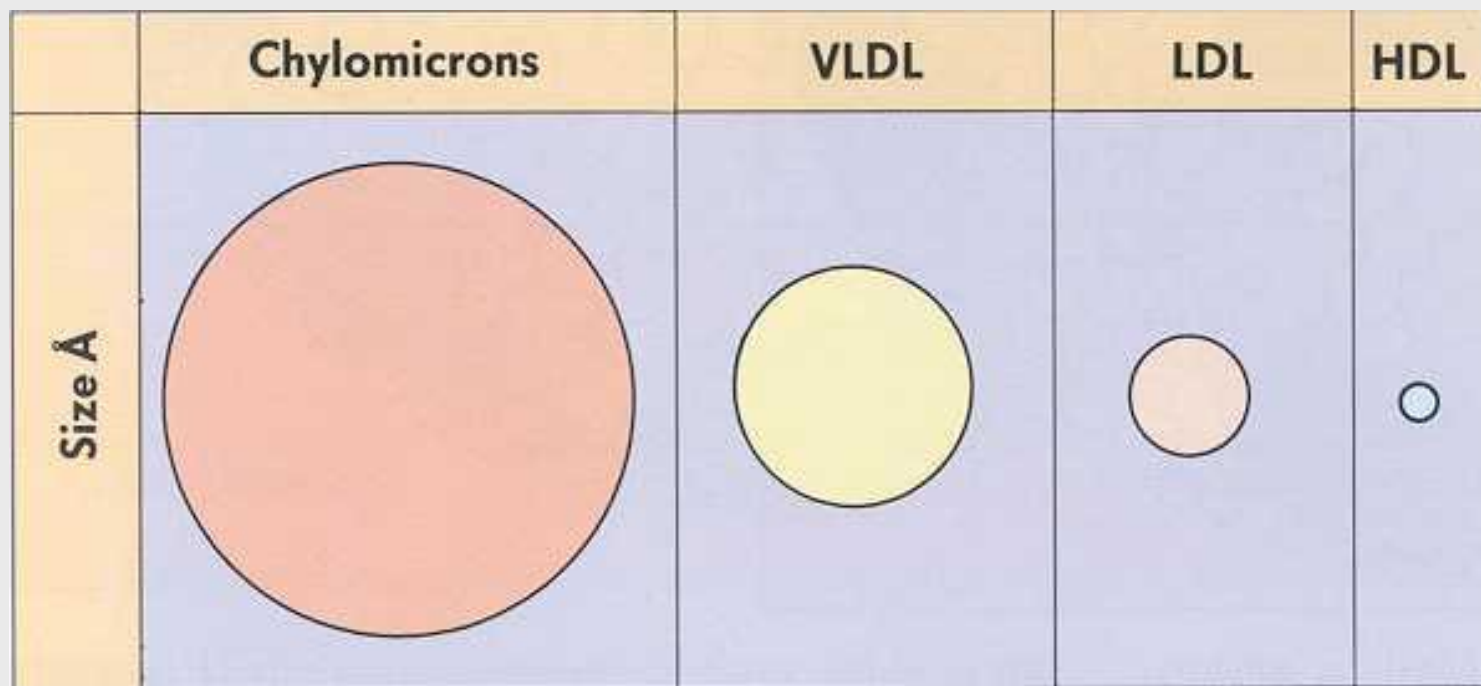


ApoAI	SP1-01 WHO
ApoB	SP3-07 WHO
Lp(a)	IFCC SRM 2B

# Rozdělení lipoproteinů

Lp(a)

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



# Chylomikrony (CM)

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

# Jaký je osud chylomikronů v krvi ?

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

# Jaké jsou další změny VLDL?

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

# LDL

- vznikají z VLDL a IDL

- oxidované LDL

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

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

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

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

# Jaký je osud IDL a LDL?

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



# Vychytávání LDL pomocí specifických receptorů

LDL

Specifická interakce mezi Apo-B100 a receptorem

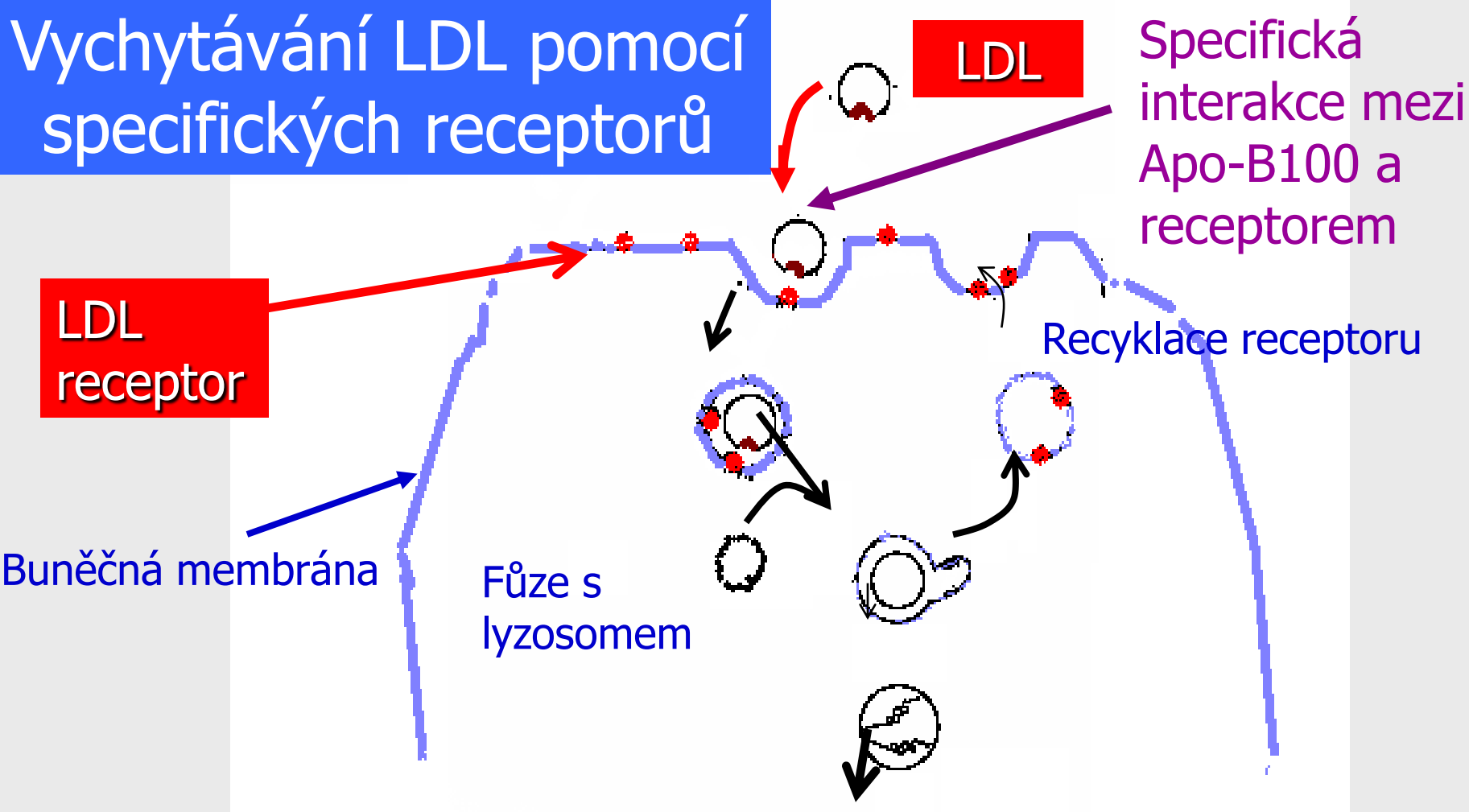
LDL receptor

Recyklace receptoru

Buněčná membrána

Fúze s lyzosomem

Uvolnění cholesterolu z LDL do buňky



# Regulace hladiny cholesterolu v buňce

## 1. regulace příjmu

(zvýšená hladina cholesterolu v buňce reguluje počet LDL-receptorů)

## 2. regulace syntézy cholesterolu

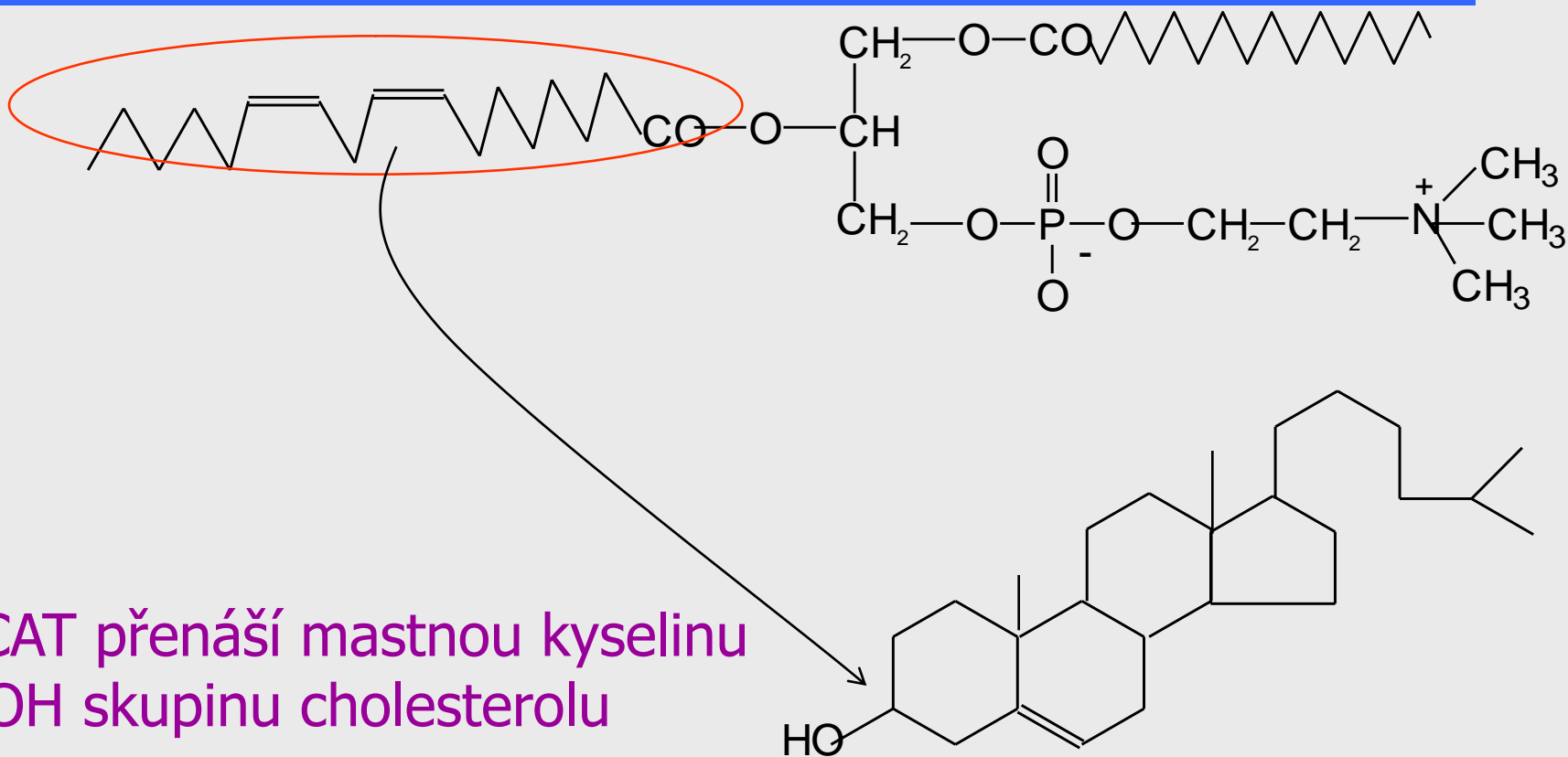
regulace tvorby HMG-CoA synthasy

inhibice HMG-CoA –reduktasy cholesterolem

# HDL

- vznikají v hepatocytech\_ (částečně i v enterocytech)
- HDL přijímají cholesterol z periferních tkání a zprostředkují jeho transport do jater
- pro jejich funkci je důležitý enzym LCAT  
lecitincholesterolacyltransferáza – esterifikace cholesterolu
- existuje několik typů HDL (HDL<sub>1</sub> – HDL<sub>3</sub>), které se liší velikostí a obsahem lipidů

# Funkce LCAT



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

# Jak HDL přejímá cholesterol ze tkání?

- Interakce malých HDL (HDL<sub>3</sub>) s povrchem buňky prostřednictvím Apo A1
- Transportu cholesterolu se zúčastní ABC1 transportér v buňkách (ATP-binding cassette protein A1)
- Vysoké hladiny HDL-cholesterolu = prognosticky příznivý faktor pro riziko koronárních onemocnění

# Lp(a)

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

# Lp(a)

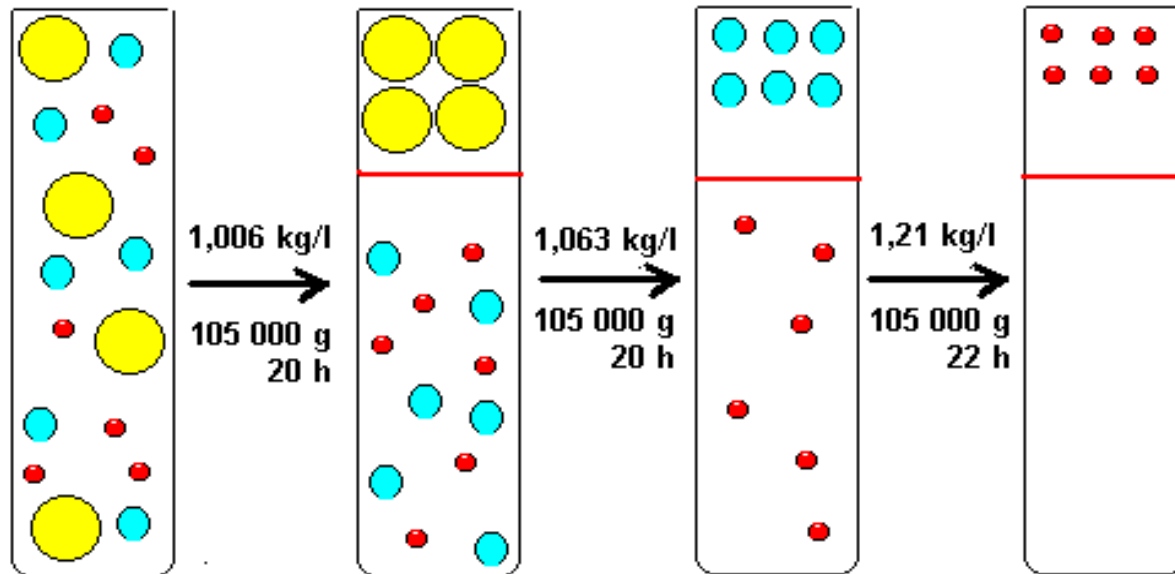
- Rizikový faktor rozvoje aterosklerózy
- Působí nezávisle na ostatních vlivech
- Referenční rozmezí: 0,06-0,30 g/l

# MEZI LIPOPROTEINY PROBÍHÁ VÝMĚNA LIPIDŮ I PROTEINŮ



# Stanovení lipoproteinů

## 1) ULTRACENTRIFUGACE



## 2) ELEKTROFORÉZA

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

**ELFO**

**Zdroj**

**FUNKCE**

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

$\alpha$

*játra, střevo*  
*VLDL, chylo*

reverzní transport  
cholesterolu

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

pre- $\beta$

*z IDL*

transport  
cholesterolu

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

*z VLDL*

prekursor LDL

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

$\beta$

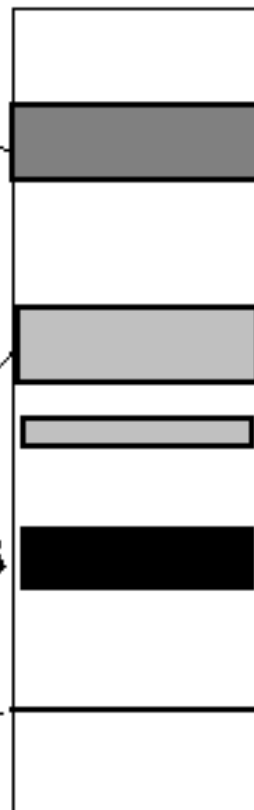
*játra*

transport  
endogenních  
triglyceridů

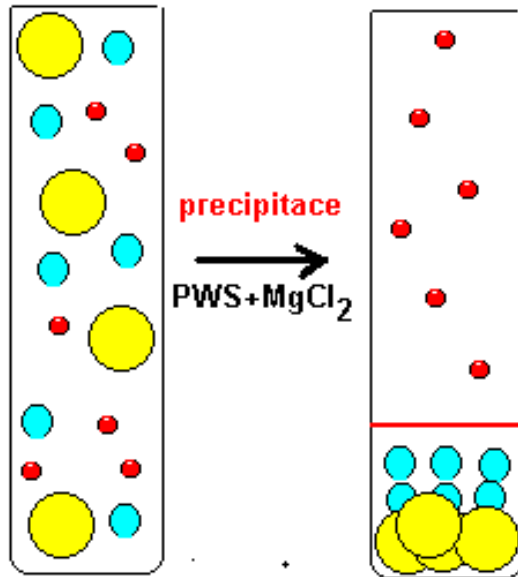
**chylomikra**  
< 0,95

start *střevo*

transport  
exogenních  
triglyceridů



### 3) SELEKTIVNÍ PRECIPITACE



-  VLDL
-  LDL
-  HDL

## 4) IMUNOSEPARACE

# Apolipoproteiny

- PROTEINOVÁ SLOŽKA LIPOPROTEINŮ
- FUNKCE:
  - AKTIVÁTORY A INHIBITORY ENZYMŮ
  - interakce s RECEPTORY
  - tvorba buněčných STRUKTUR

ApoAI

apolipoprotein v HDL

ApoB-100

apolipoprotein v LDL a VLDL

ApoB-48

apolipoprotein v chylomikronech

Apo(a)

apolipoprotein v Lp(a)

# Význam stanovení ApoB-100

## ■ Informace o počtu LDL částic

- 1 částice LDL obsahuje 1 částici Apo-B100 a různé množství cholesterolu a triacylglycerolů
- Při stejné hodnotě LDL cholesterolu vyšší hodnota Apo-B100 svědčí o větším počtu LDL částic (převaha malých hustších částic)
- Posouzení rizika kardiovaskulárních následků aterosklerózy

# Stanovení ApoAI a ApoB

1) IMUNOTURBIDIMETRIE

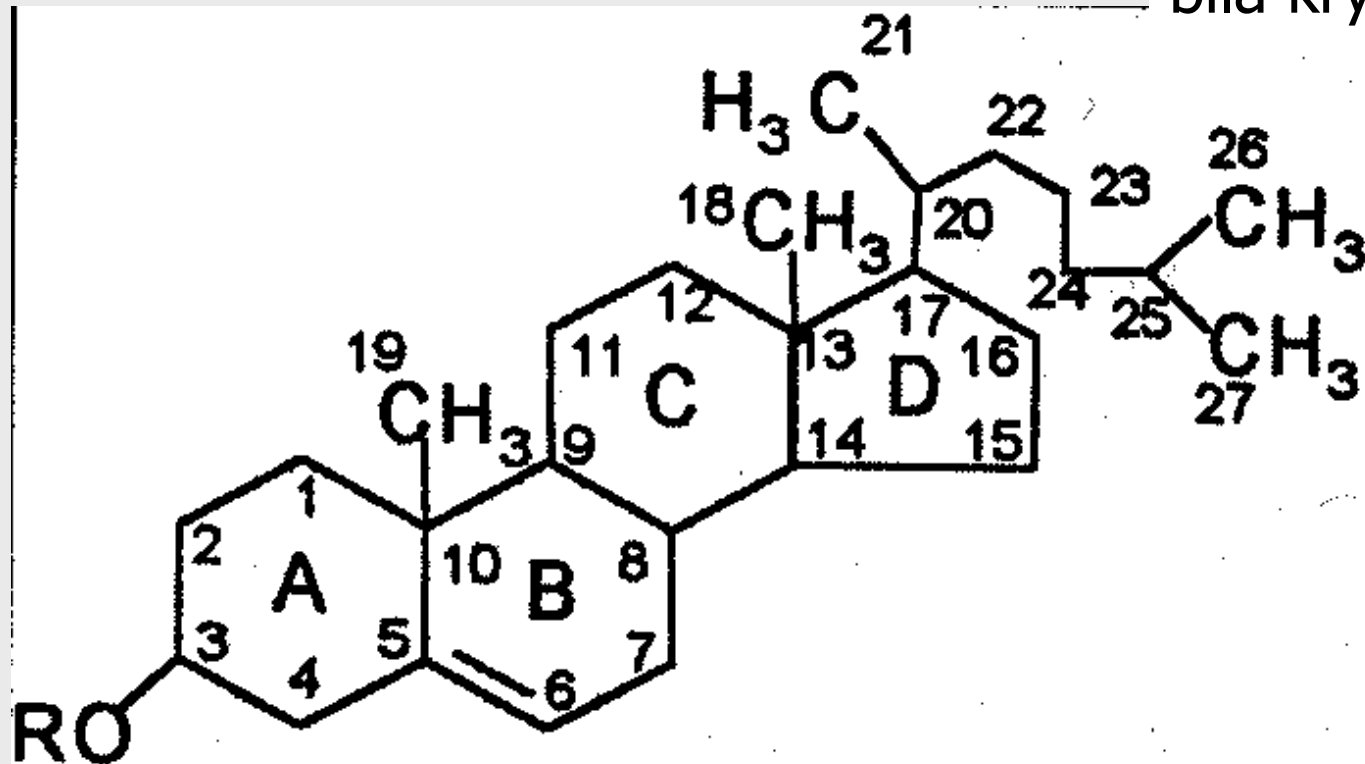
2) IMUNONEFELOMETRIE

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



# Cholesterol

bílá krystalická látka



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

R = acyl (estery cholesterolu )

**Cholesterol celkový =**

**Cholesterol + Cholesterol esterifikovaný**

# Stanovení cholesterolu

## 1. Referenční metoda (ID-GC/MS)

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

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

# Cholesterol

## 2. Enzymové stanovení

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

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

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

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

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

# Stanovení HDL cholesterolu

## 1. Referenční metoda

Preparativní ULTRACENTRIFUGACE v hustotním gradientu

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

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

# HDL cholesterol

## 2. HOMOGENNÍ (přímé) metody

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

CM

VLDL

LDL

HDL

DETERGENT

CHE + CHOD

+ protilátka

proti lidským

$\beta$  lipoproteinům

+ CHROMOGEN

CM

VLDL

LDL

HDL

Cholestenon

+

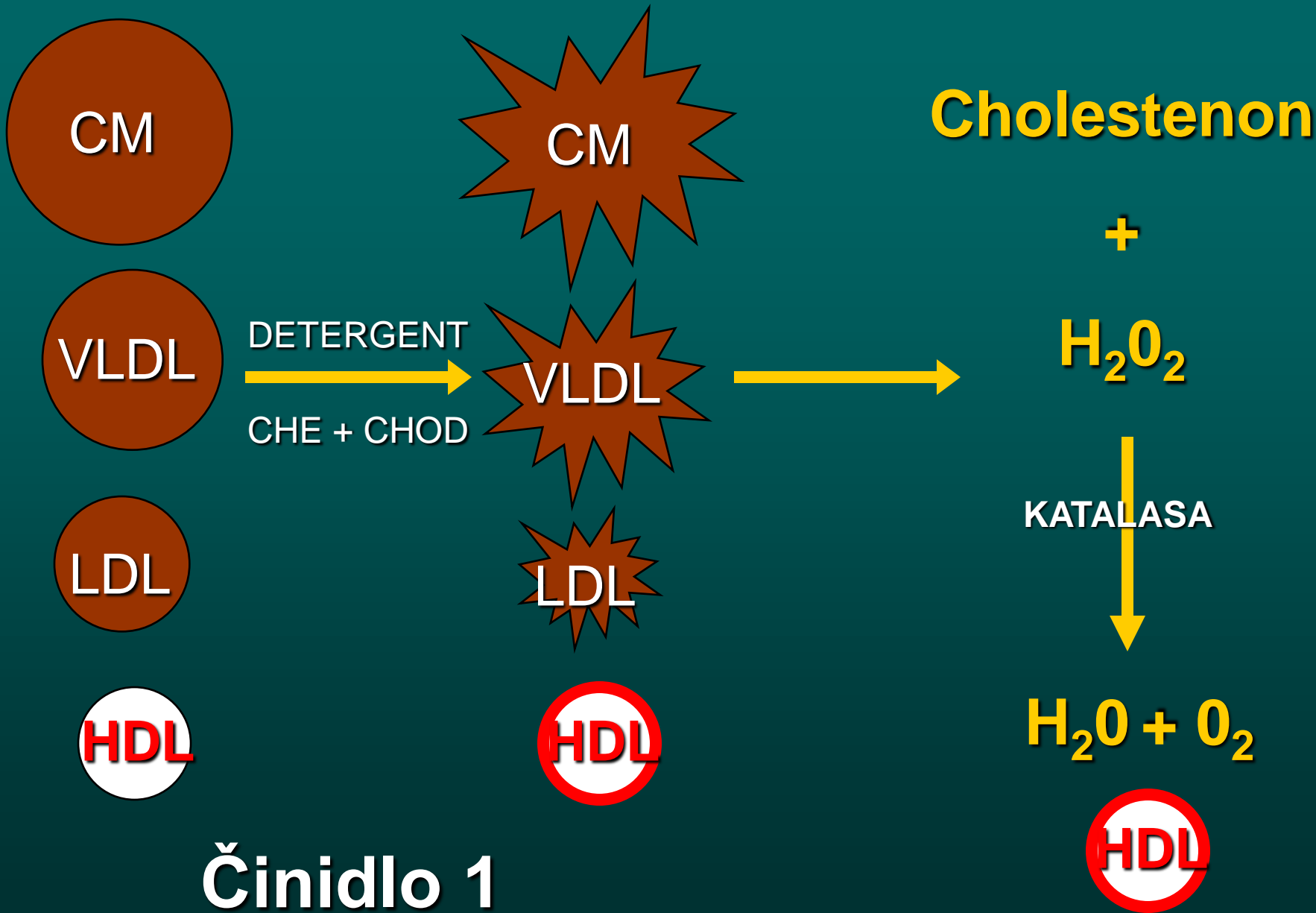
$H_2O_2$

Peroxidáza

barevný produkt

+  $H_2O$







„Uvolňovací“

DETERGENT

CHE + CHOD

+ CHROMOGEN



**Cholestenon**

+

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

PEROXIDASA



**barevný produkt + H<sub>2</sub>O**

**Činidlo 2**

# Stanovení LDL cholesterolu

## 1. Referenční metoda

Preparativní ULTRACENTRIFUGACE v hustotním gradientu

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

# LDL cholesterol

## 2. HOMOGENNÍ (přímé) metody

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

- maskování VLDL a chylomikronů cyklodextrinsulfátem
- oddělení HDL od LDL detergentem
- stanovení cholesterolu v LDL
- detekce peroxidu vodíku za tvorby zbarvení

## b) metody s odstraněním non-LDL částic

- Rozložení non-LDL částic za přítomnosti detergentu a polyaniontu, za přítomnosti CHE a CHOD proběhne stanovení cholesterolu na peroxid vodíku, který je rozložen katalasou bez tvorby zbarvení
- po přidání 2.reagencie obsahující detergent dojde k solubilizaci LDL a enzymovému stanovení cholesterolu z LDL částic (detekce peroxidu vodíku za tvorby zbarvení)

### 3. Výpočet koncentrace LDL cholesterolu(Friedewald)

$$\text{LDLChol(mmol/l)} = \text{Celkový Cholesterol} - \text{HDLChol} - 0,45 \cdot \text{TG}$$

- nutné stanovit HDLcholesterol, celkový cholesterol a TG
- neplatí při hyperTG
- požadavek 12-14h lačnění

# Vypočítané parametry

- LDL-cholesterol (Friedewald)

$\text{LDL-Chol} = \text{celkový Chol} - \text{HDL-Chol} - \text{TG} \cdot 0,45$

- Non-HDL-cholesterol

$\text{celkový CHOL} - \text{HDLcholesterol}$

- Aterogenní index

$(\text{celkový cholesterol} - \text{HDLcholesterol}) / \text{HDLcholesterol}$

- Chol/HDL

# Doporučené hodnoty

- LDL-cholesterol (Friedewald) 1,2-3,0 mmol/l
- Non-HDL-cholesterol <3,8
- Aterogenní index <3,8
- Chol/HDL <5,0



# Triacylglyceroly

Triacylglyceroly = estery glycerolu

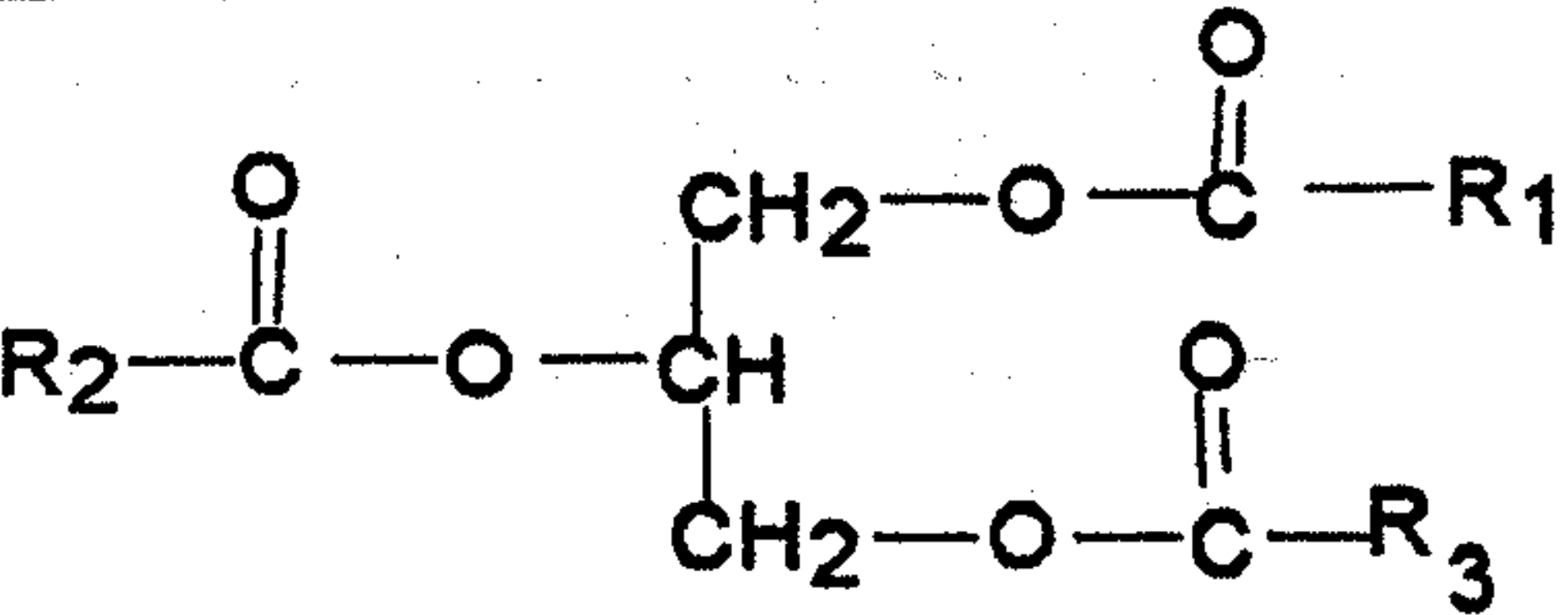
Problémy při stanovení:

volný glycerol

diacylglyceroly

monoacylglyceroly

# Triacylglyceroly



# Stanovení triacylglycerolů

## 1. Referenční metoda (ID-GC/MS)

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

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

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

# Triacylglyceroly

## 2. Enzymové stanovení

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

triacylglyceroly + 3H<sub>2</sub>O ↔ glycerol + 3 mastné kyseliny

LIPASA

glycerol + ATP ↔ glycerol-3-fosfát + ADP

GLYCEROLKINASA (GK)

glycerol-3-fosfát + O<sub>2</sub> ↔ dihydroxyacetonfosfát + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

GLYCEROLFOSFÁTOKSIDASA (GPO)

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

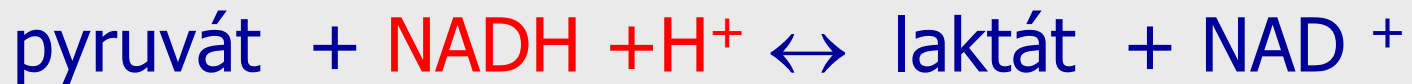
PEROXIDASA (POD)



GLYCEROLKINASA (GK)



PYRUVÁTKINASA (PK)



LAKTÁTDEHYDROGENASA (LD)

# Doporučené hodnotící meze

Klinická biochemie a metabolismus, 1 (2010) 45-46

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