

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

I. Krev a lymfatický systém

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

lipidy + apolipoproteiny = lipoproteiny

II. Zásobní lipidy a v buněčných membránách

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?

Jaké jsou doporučené metody?

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

Jaká je povolená chyba v EHK?

Analyt	TMU (SEKK 2011)	TMU teoretické
Cholesterol	*8,5%	8,5%
Triacylglyceroly	15%	28%
Cholesterol HDL	15%	11%
Cholesterol LDL	15%	%
Apo AI	21%	9,1%
Apo B	21%	12%
Lp(a)	40%	%
* Je-li TV typu ALTM		
Je-li TV typu RMP:	-13,5 až 8,5%	

Cholesterol: výpočet teoretické TMU

(CV _w) Intraindividuální biologická variabilita*	5,4%	(CV _a) Přesnost odvozená z biologických variabilit	2,7%
(CV _g) Interindividuální biologická variabilita*	15,2%	(b) Systematická chyba (bias) odvozená z biologických variabilit	4,0%
(CV _b) Celková biologická variabilita	16,1%	Celková chyba (TE) odvozená z biologických variabilit Teoretická TMU (cílová nejistota měření)	8,5%

www.westgard.com

Variabilita (proměnlivost)

$$TE = |b| + 1,65.CV_a = 0,25.CV_b + 1,65.0,5.CV_w \quad (\%)$$

$$CV_b = \sqrt{CV_w^2 + CV_g^2} \quad [\%]$$

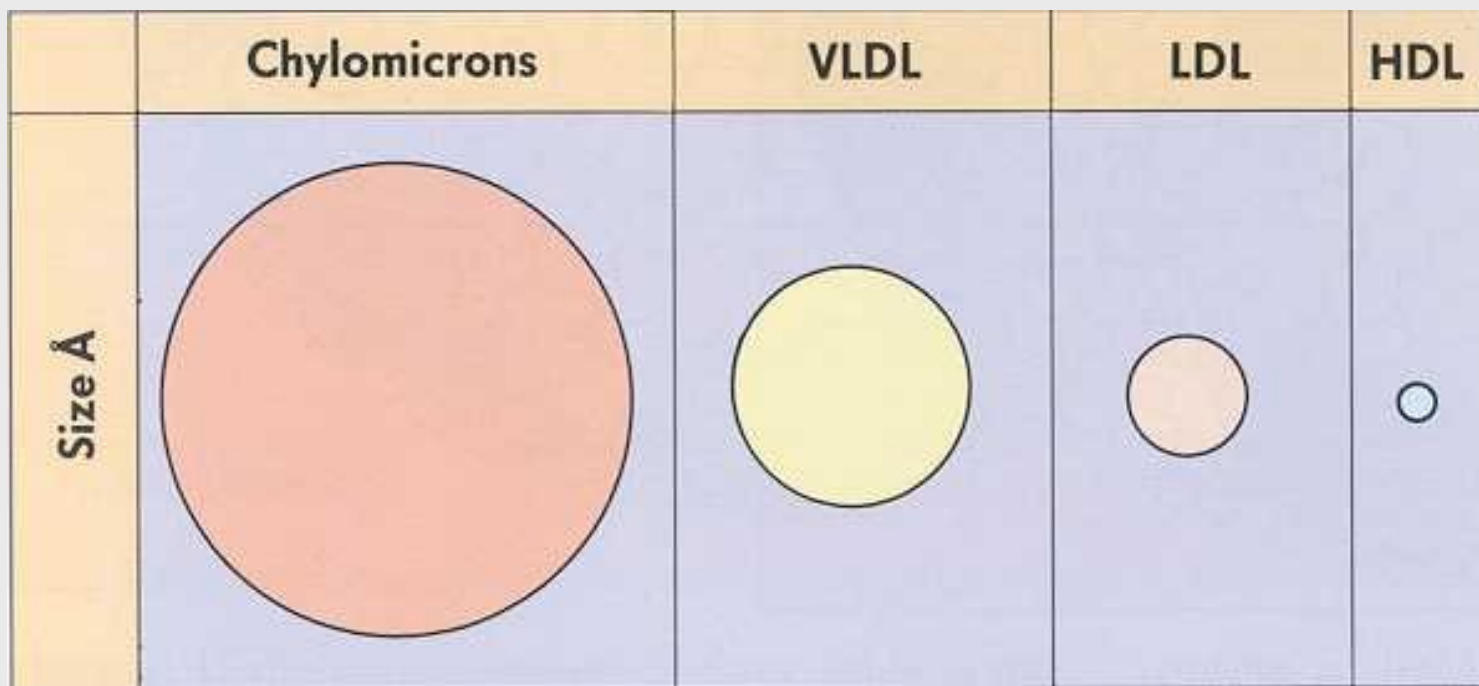
$$CV_a = 0,5.CV_w \quad [\%]$$

$$b = 0,25.CV_b = 0,25.\sqrt{CV_w^2 + CV_g^2} \quad [\%]$$

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_{II}
- v krevních kapilárách na CM působí lipoproteinová lipáza

VLDL

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

Jaké jsou další změny VLDL?

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

LDL

- vznikají z VLDL a IDL

- oxidované LDL

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

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

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

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

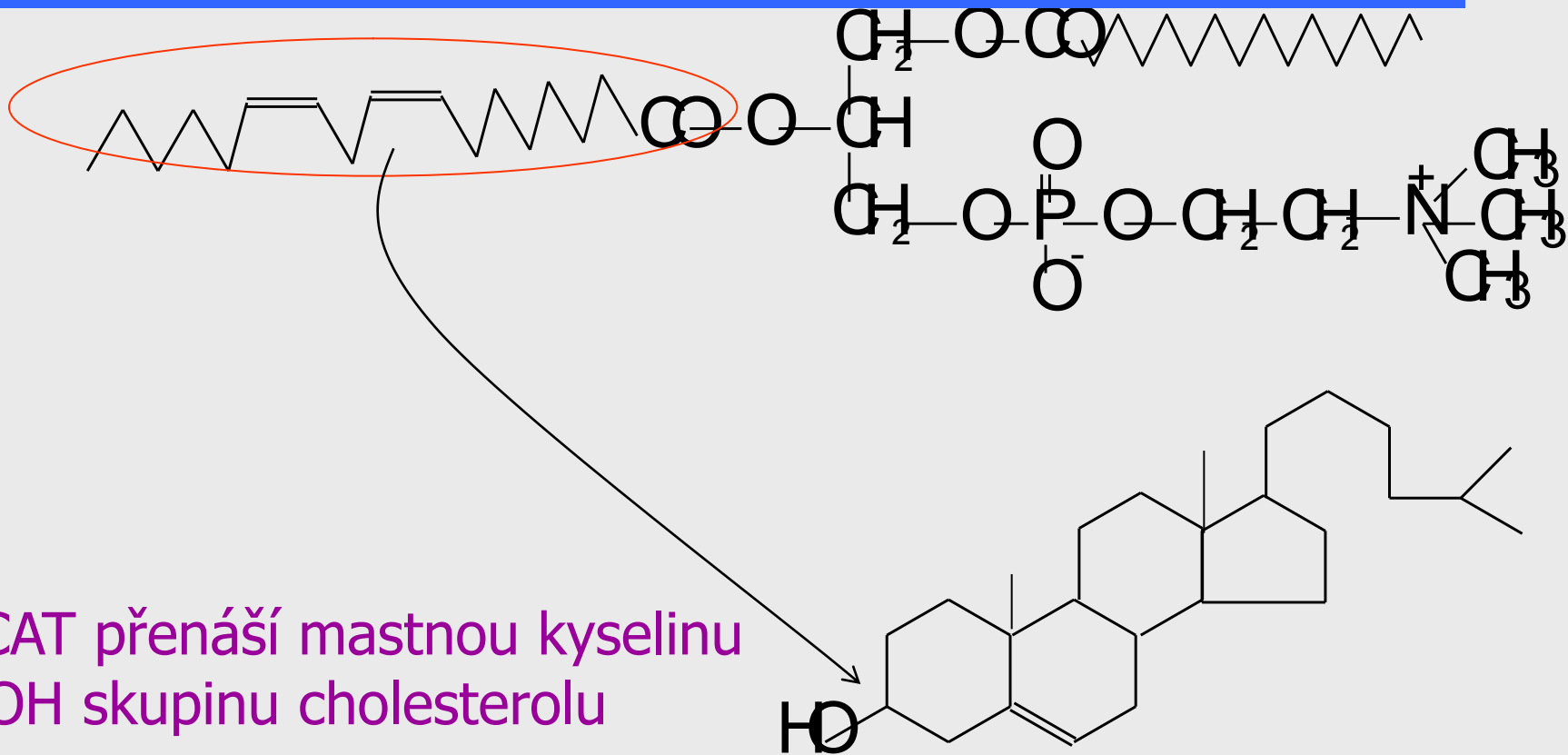
Jaký je osud IDL a LDL?

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

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 (HDL₁ – HDL₃), které se liší velikostí a obsahem lipidů

Funkce LCAT



Lp(a)

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

• Syntéza apo(a)

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

• Odbourávání

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

• Ovlivnění (interindividuální rozdíly až 1000x)

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

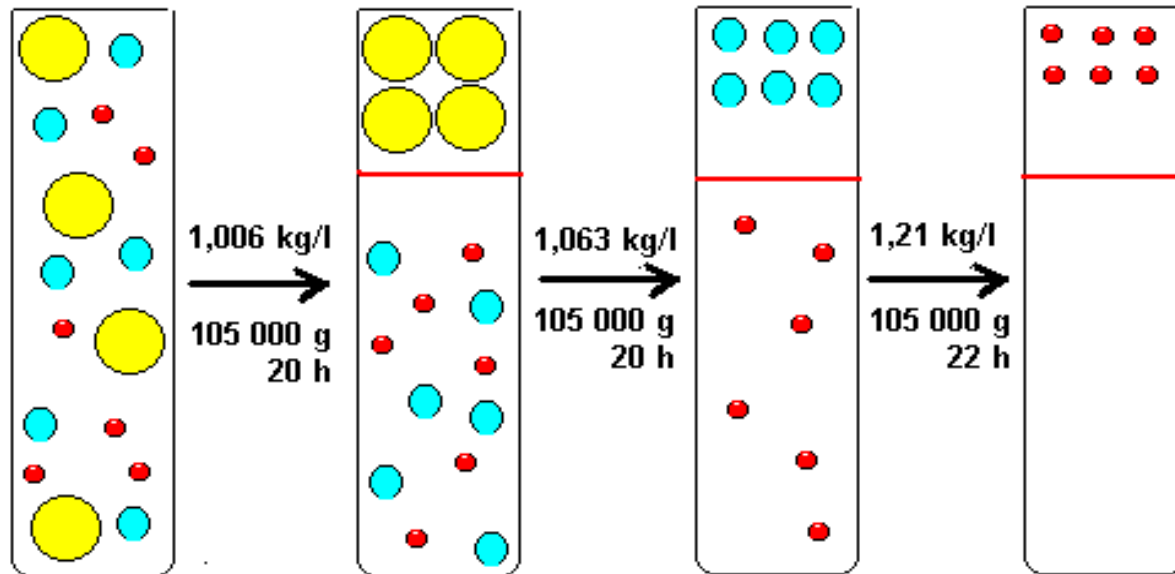
– Pozitivní reaktant akutní fáze (↑ infekce, nefrotický syndrom ...)

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

MEZI LIPOPROTEINY PROBÍHÁ VÝMĚNA LIPIDŮ I PROTEINŮ

Stanovení lipoproteinů

1) ULTRACENTRIFUGACE



2) ELEKTROFORÉZA

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

ELFO

Zdroj

HDL
1,064-1,21

α

játra, střevo
VLDL, chylo

reverzní transport
cholesterolu

LDL
1,02-1,063

pre- β

z IDL

transport
cholesterolu

IDL
1,007-1,019

z VLDL

prekursor LDL

VLDL
0,96-1,006

β

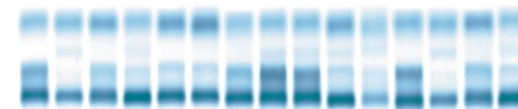
játra

transport
endogenních
triglyceridů

chylomikra
< 0,95

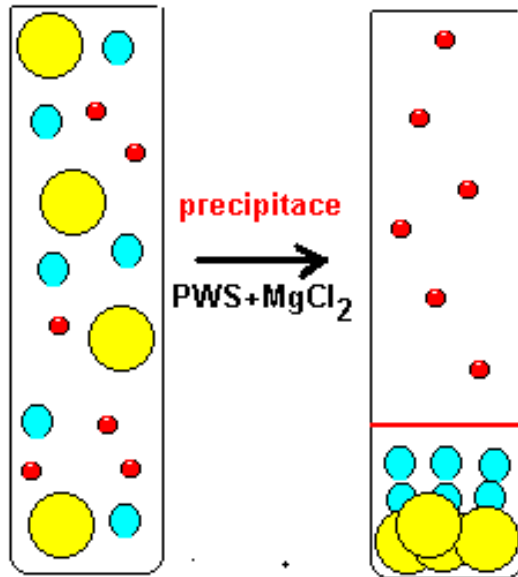
start *střevo*

transport
exogenních
triglyceridů



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

3) SELEKTIVNÍ PRECIPITACE



- VLDL
- LDL
- HDL

Apolipoproteiny

- PROTEINOVÁ SLOŽKA LIPOPROTEINŮ

- FUNKCE:

AKTIVÁTORY A INHIBITORY ENZYMŮ

interakce s RECEPTORY

tvorba buněčných STRUKTUR

účast na přenosu nebo výměně lipidových částic

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

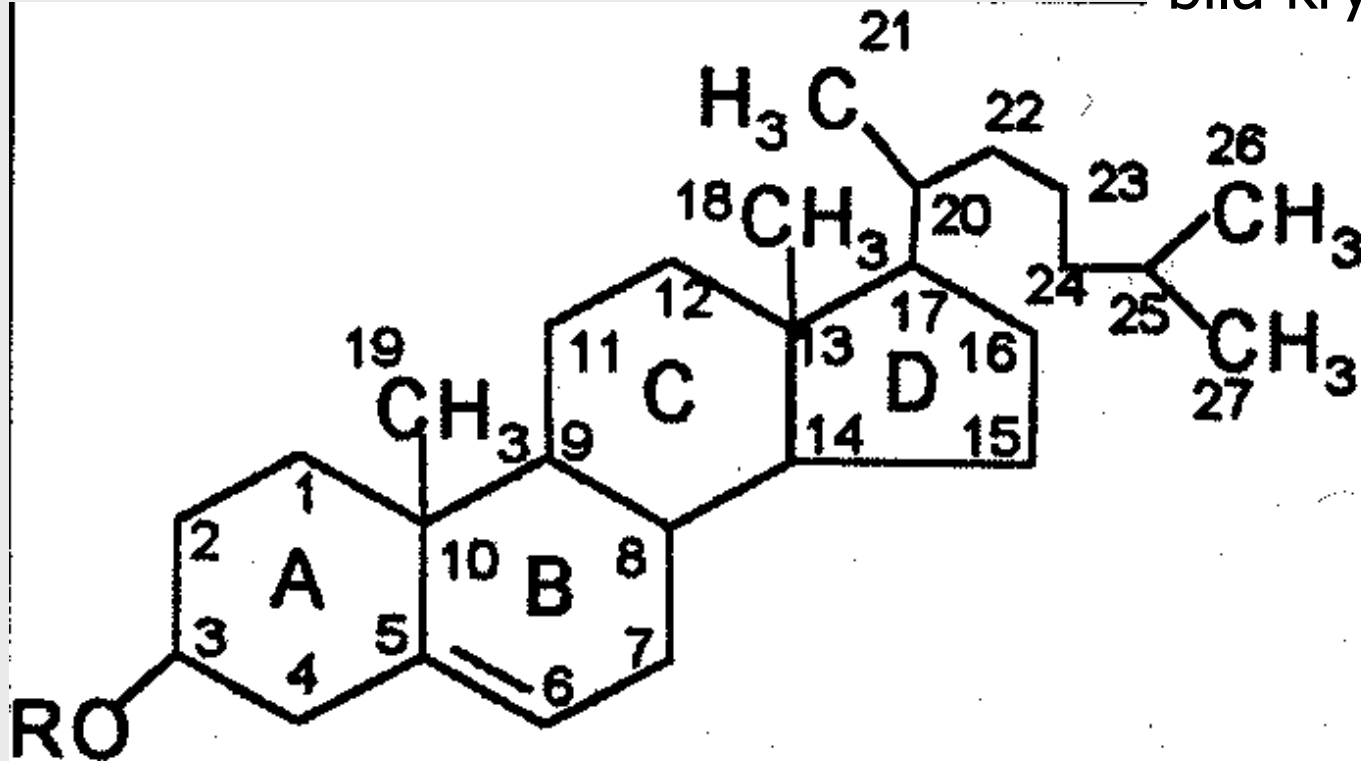
1) IMUNOTURBIDIMETRIE

2) IMUNONEFELOMETRIE

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

Cholesterol

bílá krystalická látka



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

$R = \text{acyl}$ (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- ¹³ C ₂) 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 + H₂O ↔ cholesterol + mastné kyseliny (CHE)

cholesterol + O₂ ↔ Δ⁴-cholesten-3-on + H₂O₂ (CHOD)

H₂O₂ + chromogen ↔ H₂O₂ + barvivo (POD)

H₂O₂ + 4-aminoantipyrin + derivát fenolu ↔ chinoniminové barvivo + 4 H₂O

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 β -lipoproteinům)
- b) Maskování (Daiichi)
(polyanionové polymery)
- c) Modifikované enzymy a maskování (Kyowa)
(enzymy modifikované PEGem + sulfáty
cyklodextrinu)

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

Triacylglyceroly

Triacylglyceroly = estery glycerolu

Problémy při stanovení:

volný glycerol

diacylglyceroly

monoacylglyceroly

Odběr krve musí být nalačno (12 až 14h)

Stanovení triacylglycerolů

1. Referenční metoda (ID-GC/MS)

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

3) detekce hmotnostní spektrometrií po eluci z kolony

kalibrátor	NIST-SRM 1595 tripalmitin
vnitřní standard	(¹³ C ₃) 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 + 3H₂O ↔ glycerol + 3 mastné kyseliny

LIPASA

glycerol + ATP ↔ glycerol-3-fosfát + ADP

GLYCEROLKINASA (GK)

glycerol-3-fosfát + O₂ ↔ dihydroxyacetonfosfát + H₂O₂

GLYCEROLFOSFÁTOKSIDASA (GPO)

2 H₂O₂ + 4-aminoantipyrin + derivát fenolu ↔ chinoniminové barvivo + 4 H₂O

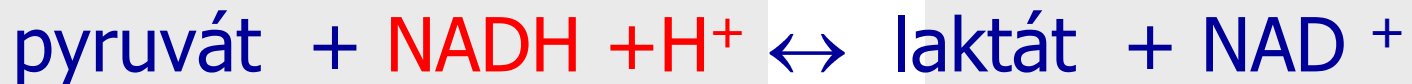
PEROXIDASA (POD)



GLYCEROLKINASA (GK)



PYRUVÁTKINASA (PK)



LAKTÁTDEHYDROGENASA (LD)

Doporučené hodnotící meze

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

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