

Lipidy

Lipidy

Lipos = tuk

- **Význam lipidů v organismu**

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

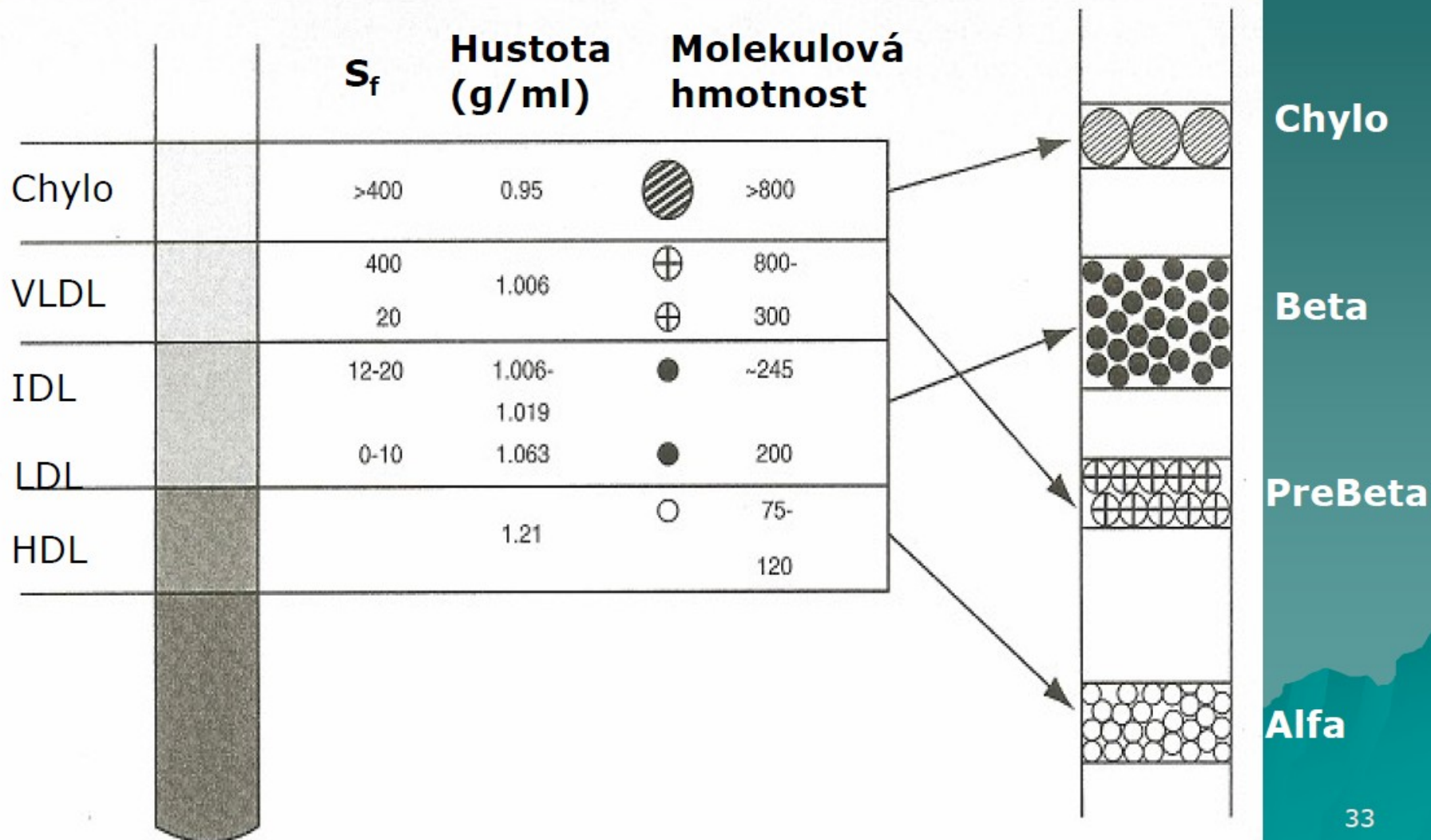
- 2) **Součást buněčných membrán** (cholesterol, fosfolipidy)

- 3) Biokatalyzátory, hormony

- 4) izolační vrstva, ochrana orgánů

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

Rozdělení lipoproteinů

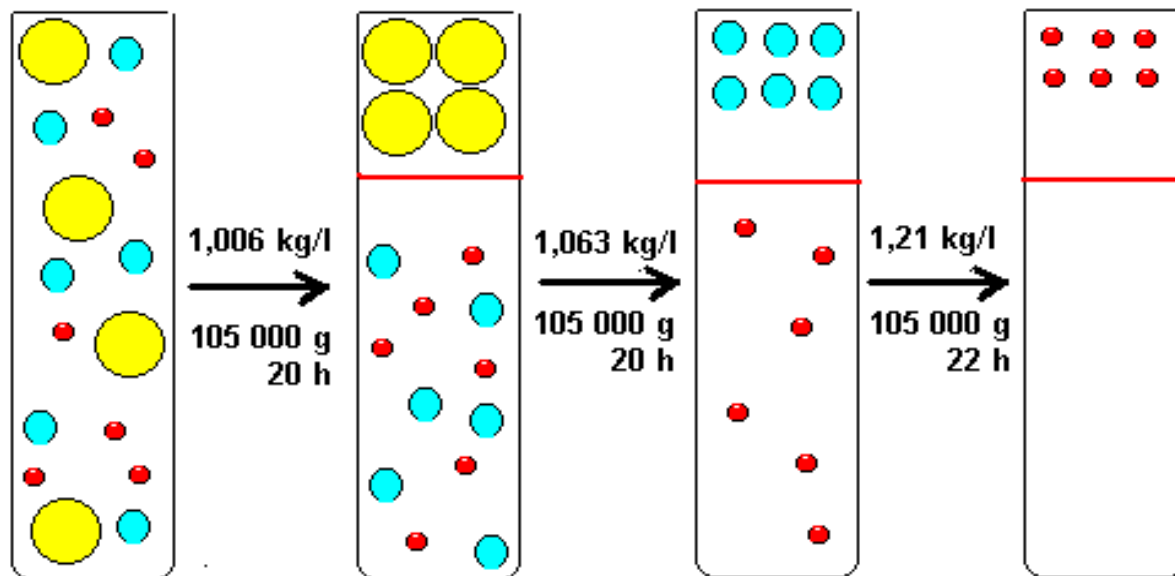


Lp(a)

- 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

Stanovení lipoproteinů

1) ULTRACENTRIFUGACE



- VLDL
- LDL
- HDL

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

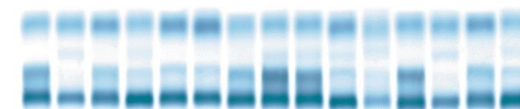
játra

transport
endogenních
triglyceridů

chylomikra
< 0,95

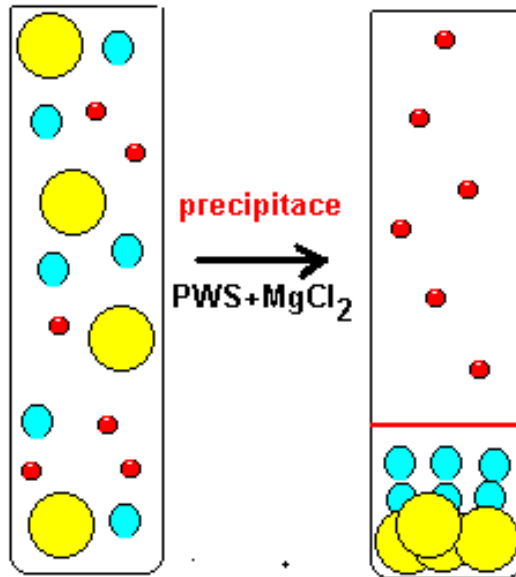
start *střevo*

transport
exogenních
triglyceridů



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

3) SELEKTIVNÍ PRECIPITACE



- VLDL
- LDL
- HDL

Stanovení ApoAI a ApoB

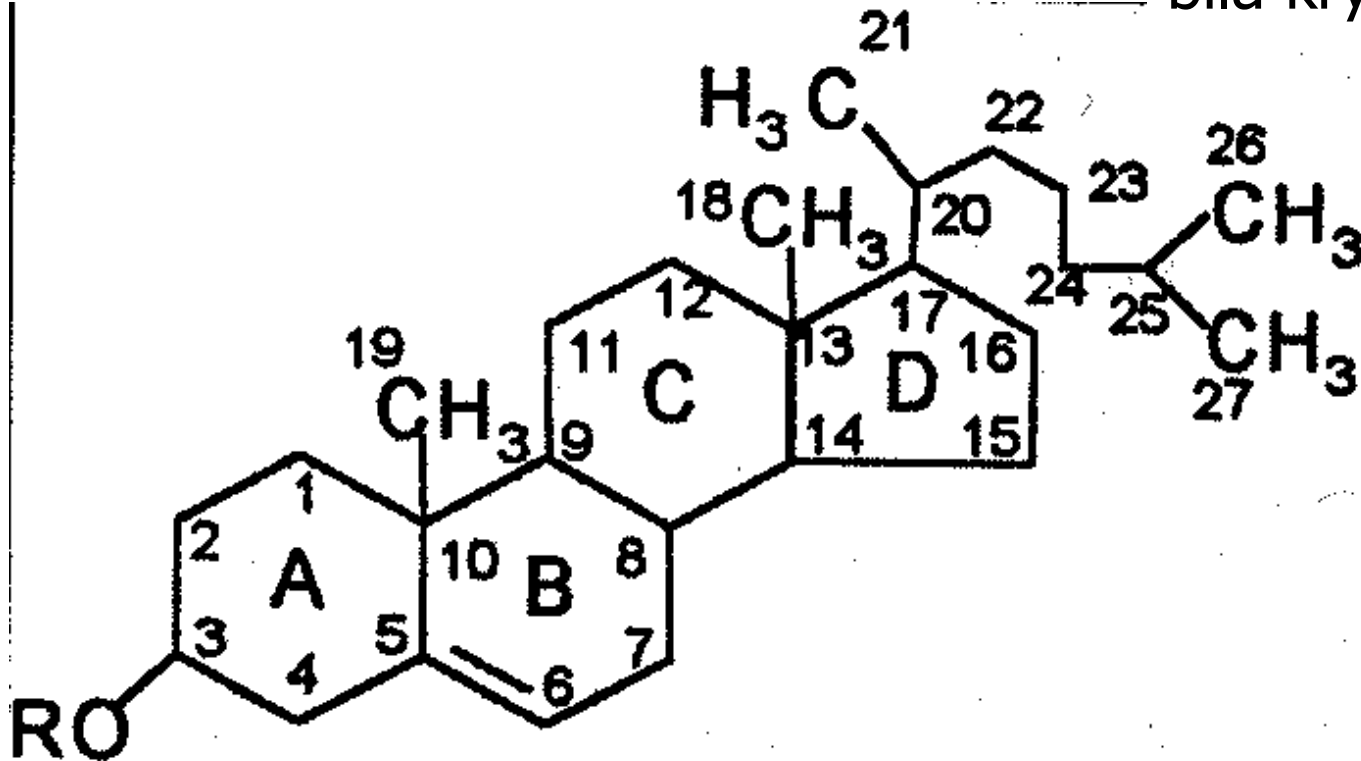
1) IMUNOTURBIDIMETRIE

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%)

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

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:
 $LDLChol = (LDL+HDL)Chol - HDLChol$

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

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

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

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

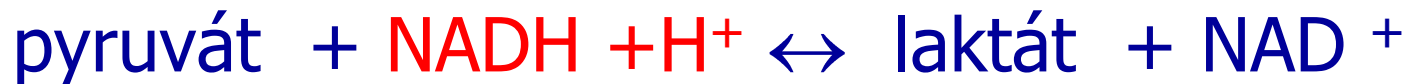
PEROXIDASA (POD)



GLYCEROLKINASA (GK)



PYRUVÁTKINASA (PK)



LAKTÁTDEHYDROGENASA (LD)

Doporučené hodnotící meze

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

Analyt	Muži		Ženy	
	Cholesterol (mmol/l)	2,90	5,00	2,90
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