

Lipidy

Lipoproteiny

Apolipoproteiny

SCORE2-OP: estimating incident cardiovascular event risk in older persons in four geographical risk regions

1. Model derivation

Competing risk-adjusted, sex-specific coefficients were derived in ~28,500 participants from the prospective CONOR study



2. Model recalibration

The model was recalibrated to four geographical risk regions using contemporary region-specific CVD event rates and risk factor levels



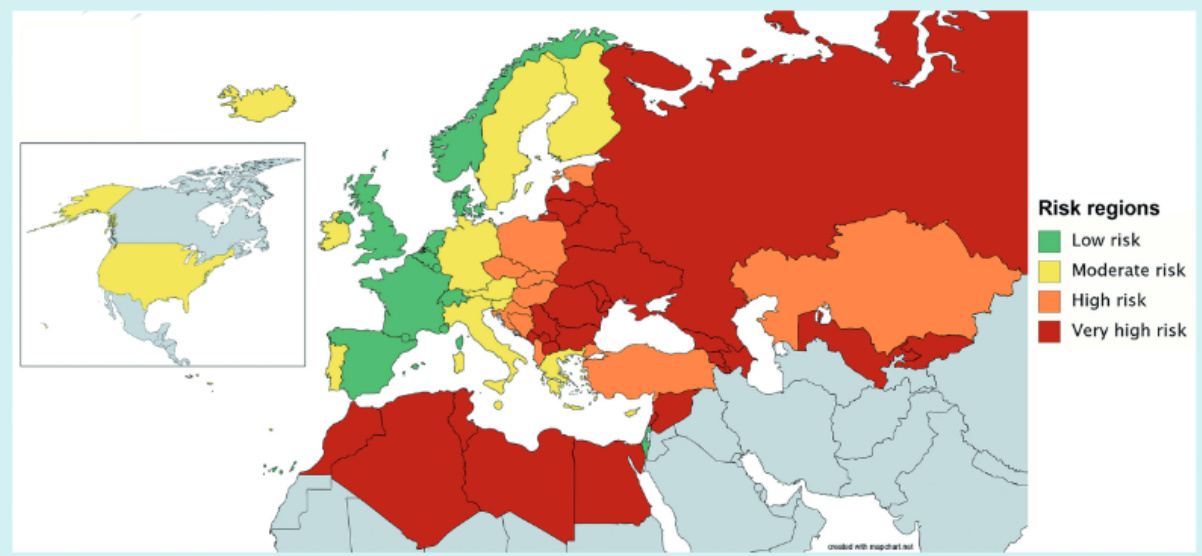
3. External validation

The model was externally validated in ~340,000 individuals from different risk regions



4. Individualized predictions

An individual's risk factor levels can be applied to the two-dimensional SCORE2-OP charts or to an online calculator to estimate their 5- and 10-year CVD event risk according to their risk region of origin



Individual example

Patient risk factors

75 years old
Smoker
No diabetes
SBP: 140 mmHg
Cholesterol: 4.5 mmol/L
HDL-c: 1.4 mmol/L



10-year risk depending on risk region:

Female				Male			
Low risk	Moderate risk	High risk	Very high risk	Low risk	Moderate risk	High risk	Very high risk
14%	18%	28%	44%	16%	21%	24%	37%

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.

Standardizace



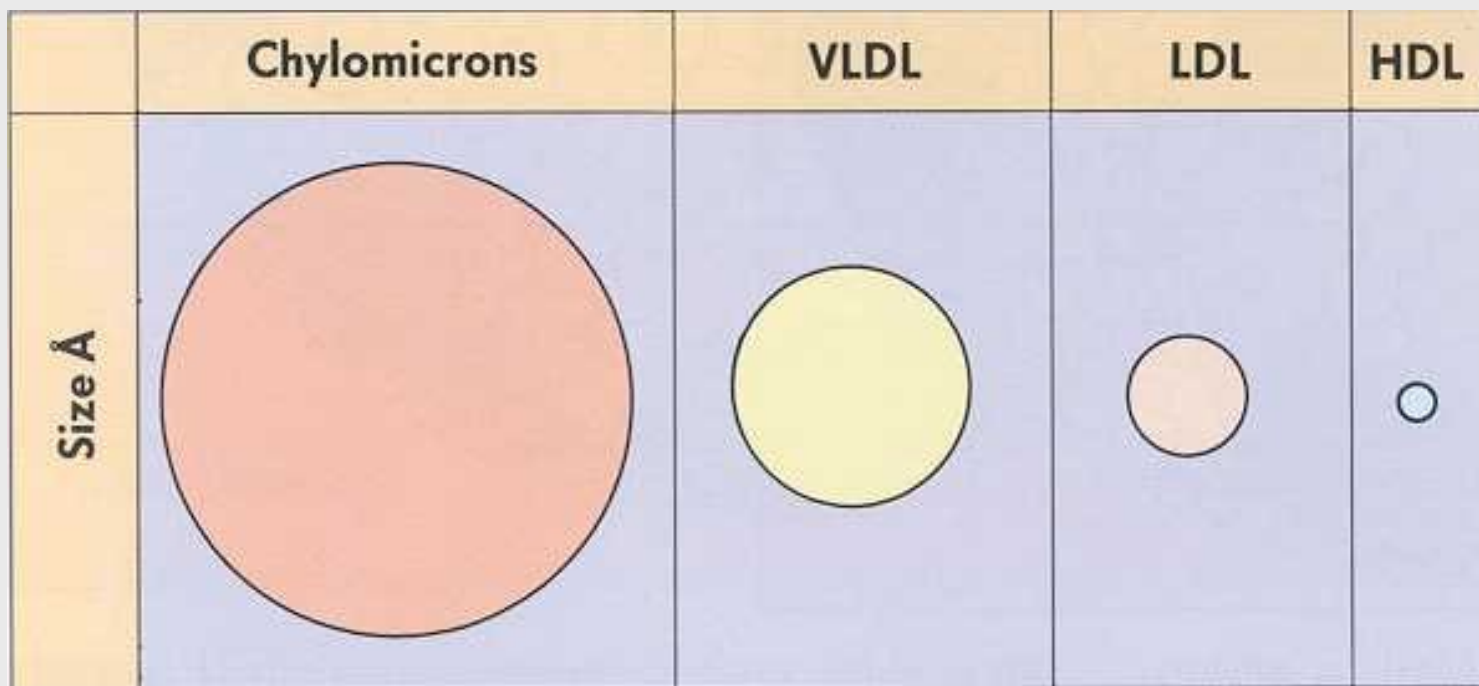
Standardizace postupu

Analyt	Referenční metoda	Návaznost na OKB FNUSA
CHOL	ID-GC/MS	Abell-Kendall a také ID-GC/MS
TG	ID-GC/MS	ID-GC/MS
HDL, LDL	Ultracentrifugace v hustotním gradientu	Hodnota standardu stanovena dle National Reference System Cholesterol
APO AI, APO B	Není	CRM SP1-01, CRM SP3-07
Lp(a)	Není	IFCC SRM2B pro nmol/l

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

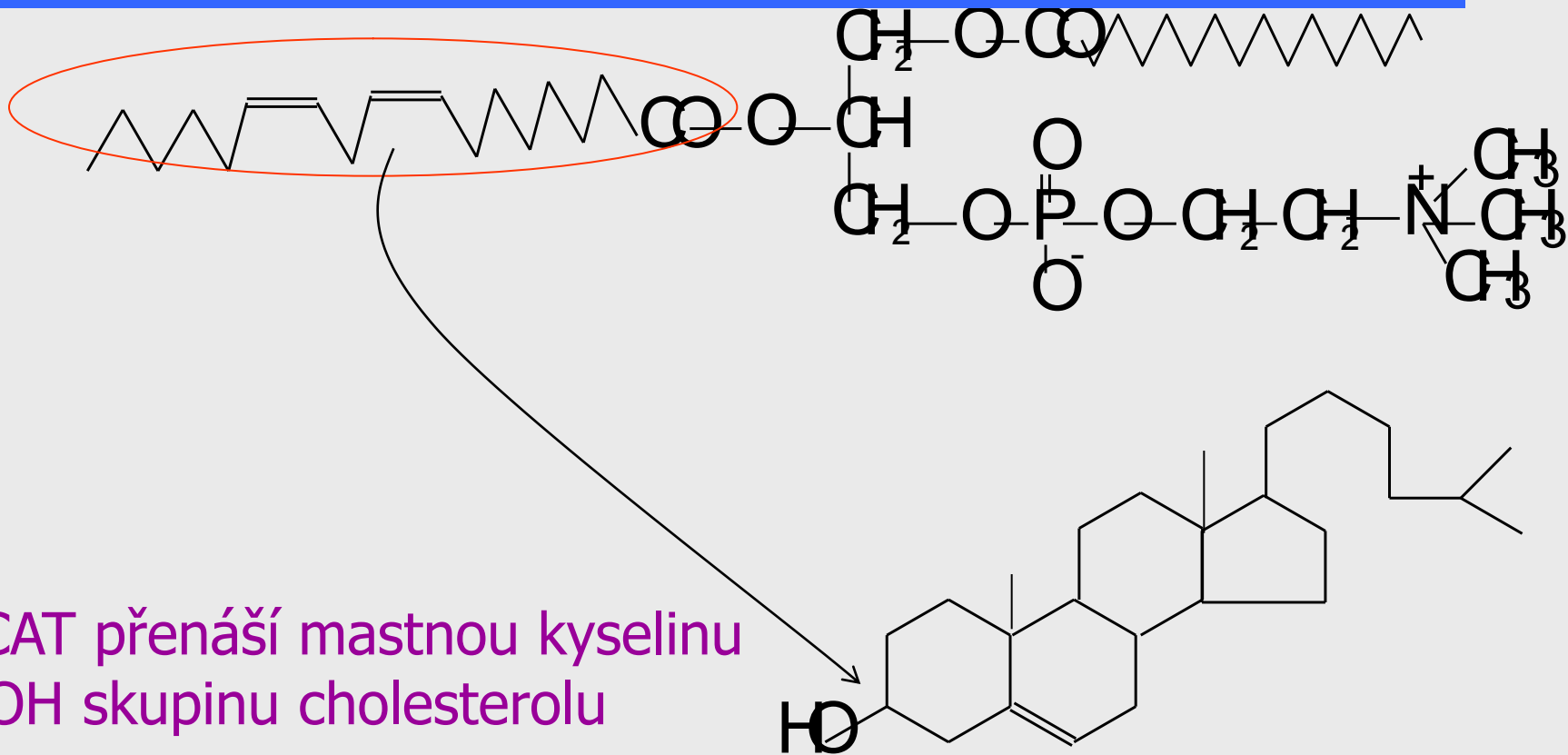
Jaký je osud IDL a LDL?

- 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 endocytozou (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



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

Lp(a)

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

• Syntéza apo(a)

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

• Odbourávání

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

• Ovlivnění (interindividuální rozdíly až 1000x)

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

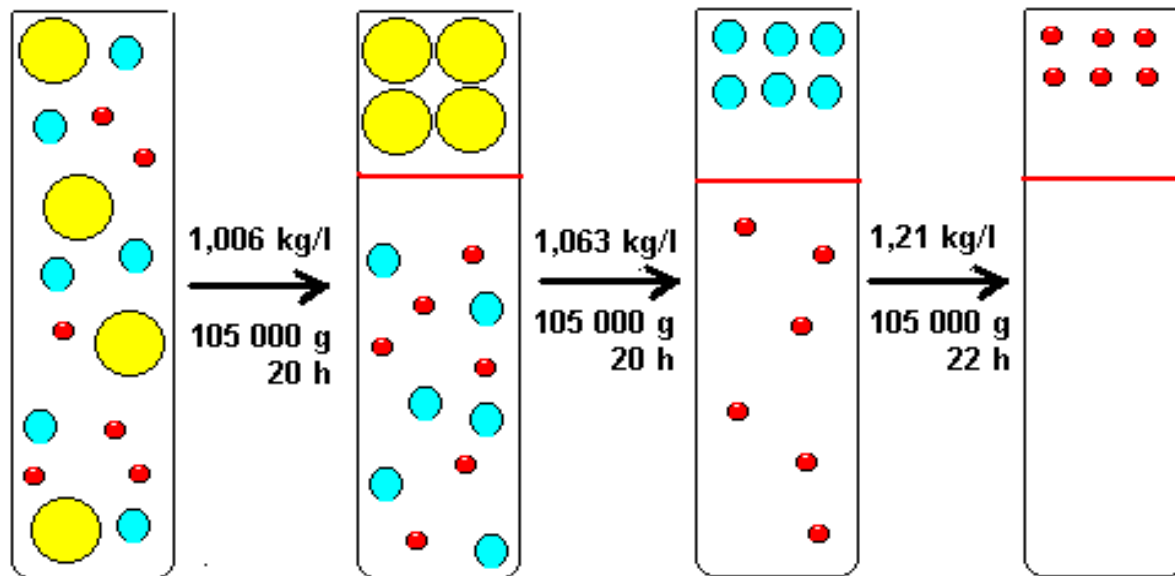
– Pozitivní reaktant akutní fáze (↑ infekce, nefrotický syndrom ...)

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

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

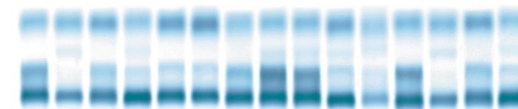
játra

transport
endogenních
triglyceridů

chylomikra
< 0,95

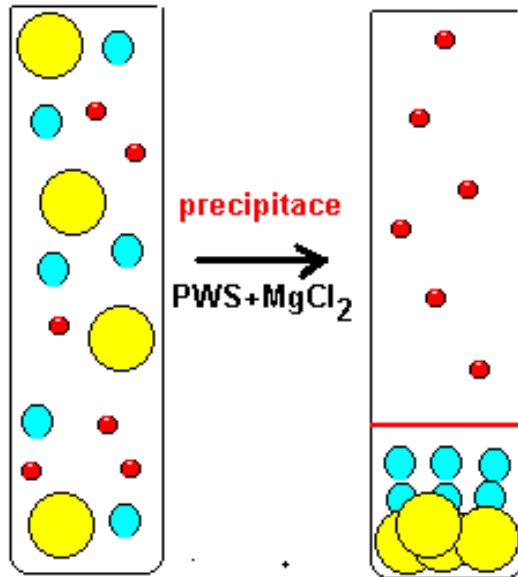
start *střevo*

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

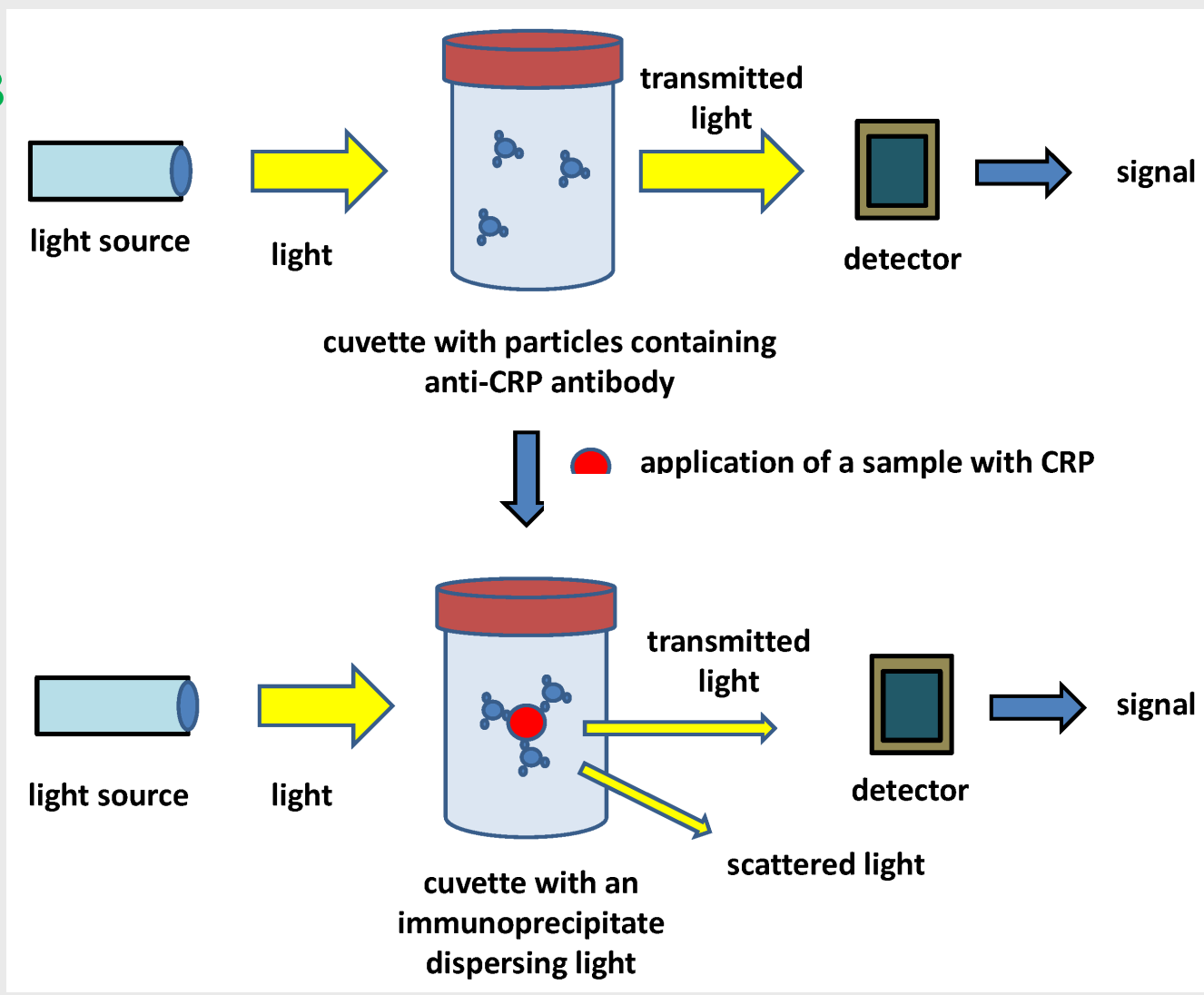
Stanovení ApoAI a ApoB

1) IMUNOTURBIDIMETRIE

2) IMUNONEFELOMETRIE

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

- Apolipoprotein AI
g/l
- Apolipoprotein B
g/l

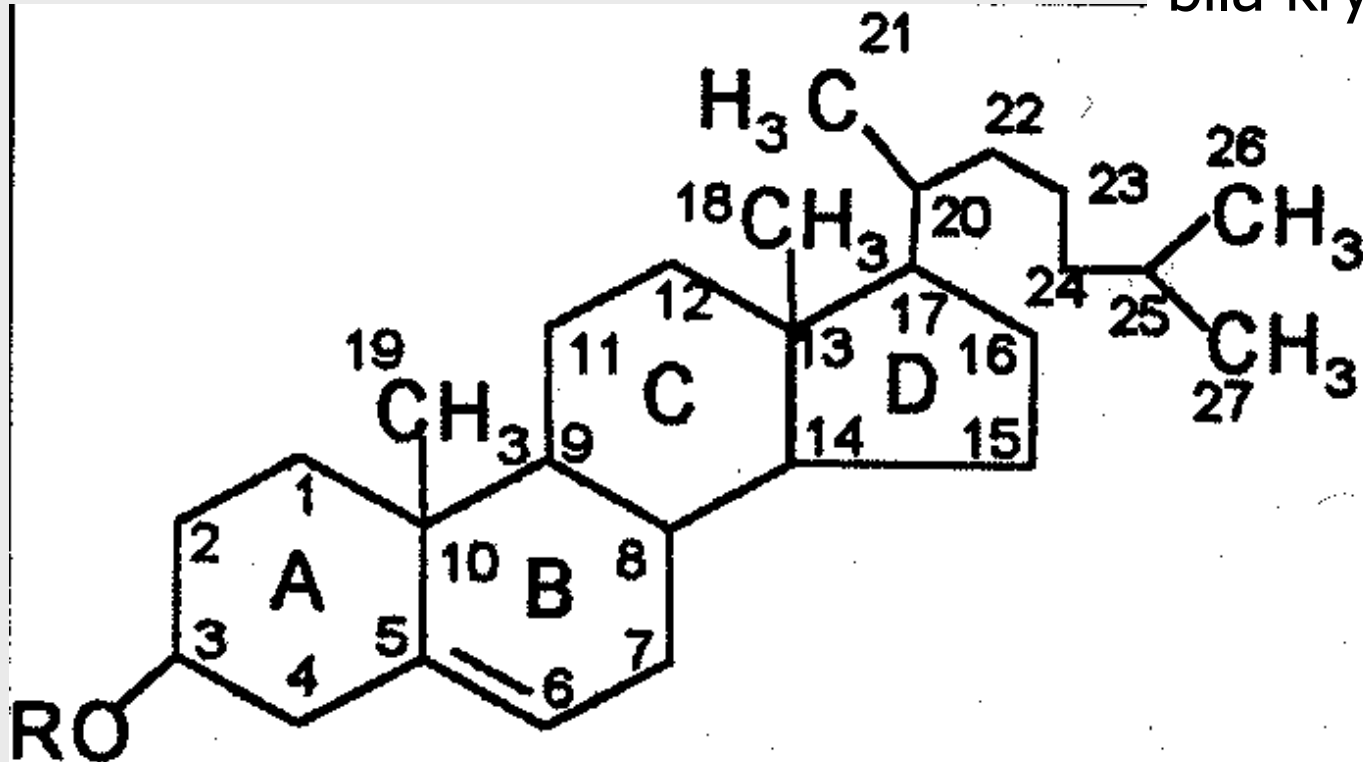


Lipoprotein(a)

- **Nedostatečná úroveň standardizace**
- **Měření v molárních jednotkách nebo hmotnostních jednotkách (druhé je v současnosti častější)**
- **Měření v hmotnostních jednotkách a přepočet na molární? Nemělo by se provádět.**

Cholesterol

bílá krystalická látka



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

$R = \text{acyl}$ (estery cholesterolu)

February 2023

Infographic explaining the transitioning to a new RMS for apolipoproteins:

METROLOGICAL TRACEABILITY OF APOLIPOPROTEIN TESTS: TRANSITIONING TO AN SI-TRACEABLE REFERENCE MEASUREMENT SYSTEM

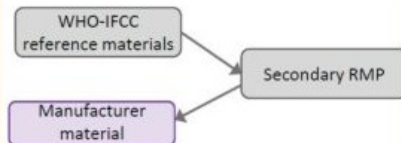
CURRENT

- Immunoassay-based reference measurement procedure (RMP) no longer operational
- WHO reference materials SP1-01, SP3-08, SRM2B ran out of stock in 2021/2022

WHO-IFCC Reference Materials

for apoA-I, apoB, Lp(a)
not SI-traceable, commutability unknown

Current Traceability Chain



TRANSITION

- Sera from CDC's Clinical Standardization Programs, Atlanta, GA, USA standardization@cdc.gov
- Sera from Laboratoire National de Métrologie et d'Essais (LNE), Paris, France metrology@lne.fr

For more information:

<http://www.ifcc.org/ifcc-scientific-division/sd-working-groups/wg-apo-ms/>

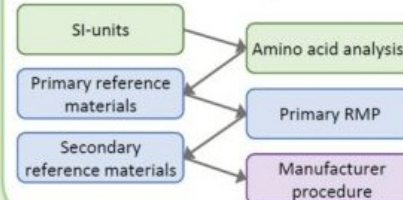
SOON

- New mass spectrometry-based reference measurement procedure (RMP) finalized by the IFCC Working Group Apolipoproteins by Mass Spectrometry (WG-APO MS)
- New serum-based reference materials with values assigned with new RMP available soon.

JRC-IFCC/LNE Reference Materials

for apoA-I, apoB, Lp(a), and other apolipoproteins
SI-traceable, commutability known
developed in collaboration with IFCC WG-APO MS

New Traceability Chain



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

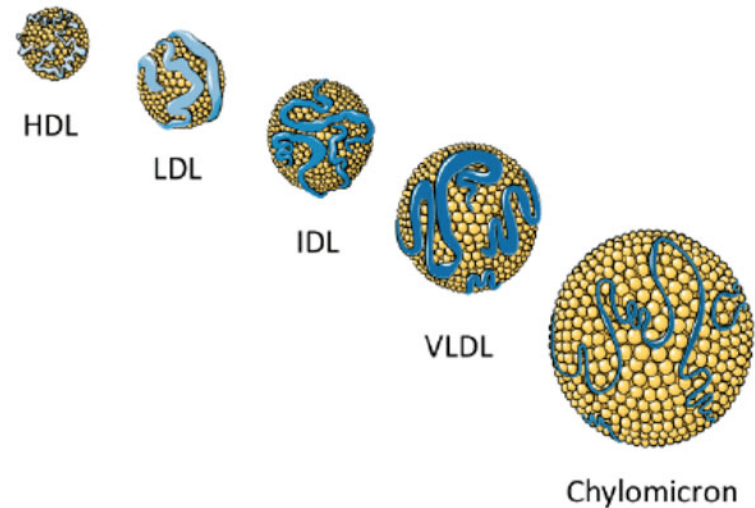
- maskování VLDL a chylomikronů cyklodextrinsulfátem
- oddělení HDL od LDL detergentem
- stanovení cholesterolu v LDL
- detekce peroxidu vodíku za tvorby zbarvení

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)

Obtíže stanovení LDL

- **Nedostatečné maskování non LDL částic v prvním kroku – nadhodnocení výsledku LDL cholesterolu**
- **HDL + LDL musí být nižší než celkový cholesterol**
- **Nedostatečná specifita detergentu 1 pro maskování LDL částic**



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

Výpočet LDL_Martin

- **LDL chol. = celkový chol. – HDL chol. - TG/F**
- **F – proměnlivý faktor odvozený z hodnot Tg a non HDL cholesterolu (celkem 180 komponent)**
- **Minimalizace interference zvýšených TG**

Výpočet LDL_Martin

Triglyceride Levels, mg/dL*	Non-HDL-C, mg/dL					
	<100	100-129	130-159	160-189	190-219	≥220
7-49	3.5	3.4	3.3	3.3	3.2	3.1
50-56	4.0	3.9	3.7	3.6	3.6	3.4
57-61	4.3	4.1	4.0	3.9	3.8	3.6
62-66	4.5	4.3	4.1	4.0	3.9	3.9
67-71	4.7	4.4	4.3	4.2	4.1	3.9
72-75	4.8	4.6	4.4	4.2	4.2	4.1
76-79	4.9	4.6	4.5	4.3	4.3	4.2
80-83	5.0	4.8	4.6	4.4	4.3	4.2
84-87	5.1	4.8	4.6	4.5	4.4	4.3
88-92	5.2	4.9	4.7	4.6	4.4	4.3
93-96	5.3	5.0	4.8	4.7	4.5	4.4
97-100	5.4	5.1	4.8	4.7	4.5	4.3
101-105	5.5	5.2	5.0	4.7	4.6	4.5
106-110	5.6	5.3	5.0	4.8	4.6	4.5
111-115	5.7	5.4	5.1	4.9	4.7	4.5
116-120	5.8	5.5	5.2	5.0	4.8	4.6
121-126	6.0	5.5	5.3	5.0	4.8	4.6
127-132	6.1	5.7	5.3	5.1	4.9	4.7
133-138	6.2	5.8	5.4	5.2	5.0	4.7
139-146	6.3	5.9	5.6	5.3	5.0	4.8
147-154	6.5	6.0	5.7	5.4	5.1	4.8
155-163	6.7	6.2	5.8	5.4	5.2	4.9
164-173	6.8	6.3	5.9	5.5	5.3	5.0
174-185	7.0	6.5	6.0	5.7	5.4	5.1
186-201	7.3	6.7	6.2	5.8	5.5	5.2
202-220	7.6	6.9	6.4	6.0	5.6	5.3
221-247	8.0	7.2	6.6	6.2	5.9	5.4
248-292	8.5	7.6	7.0	6.5	6.1	5.6
293-399	8.5	8.3	7.5	7.0	6.5	5.9
400-13975	11.9	10.0	8.8	8.1	7.5	6.7

Figure 2

Median for the Ratio of Triglycerides to Very Low-Density Lipoprotein Cholesterol by Non-High-Density Lipoprotein Cholesterol and Triglyceride Strata (180-Cell)

Omezení

- **Výpočet i přímé měření LDL nejsou spolehlivé při velmi nízké koncentraci LDL**
- **Výpočet i přímé měření LDL nejsou spolehlivé při vysokých koncentracích Tg**

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

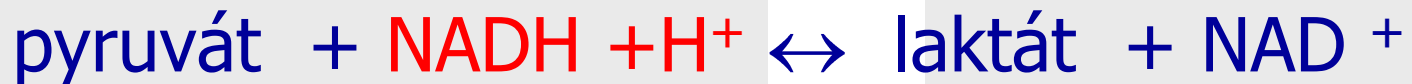
PEROXIDASA (POD)



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