Lipidy
Lipoproteiny
Apolipoproteiny

Petr Breinek

Lipidy

Lipos = tuk

Význam lipidů v organismu

1) Zdroj energie *(tukové buňky)* + *zdroj esenciálních mastných kyselin*

2) Strukturní funkce *(součást buněčných membrán)*

3) *Vitamin D, kortikoidy, pohlavní hormony, …*

4) Ochranná funkce *(tepelná izolace- tuková tkáň; neurony- myelinová pochva)*

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

Transport lipidů

I. Krev a lymfatický systém

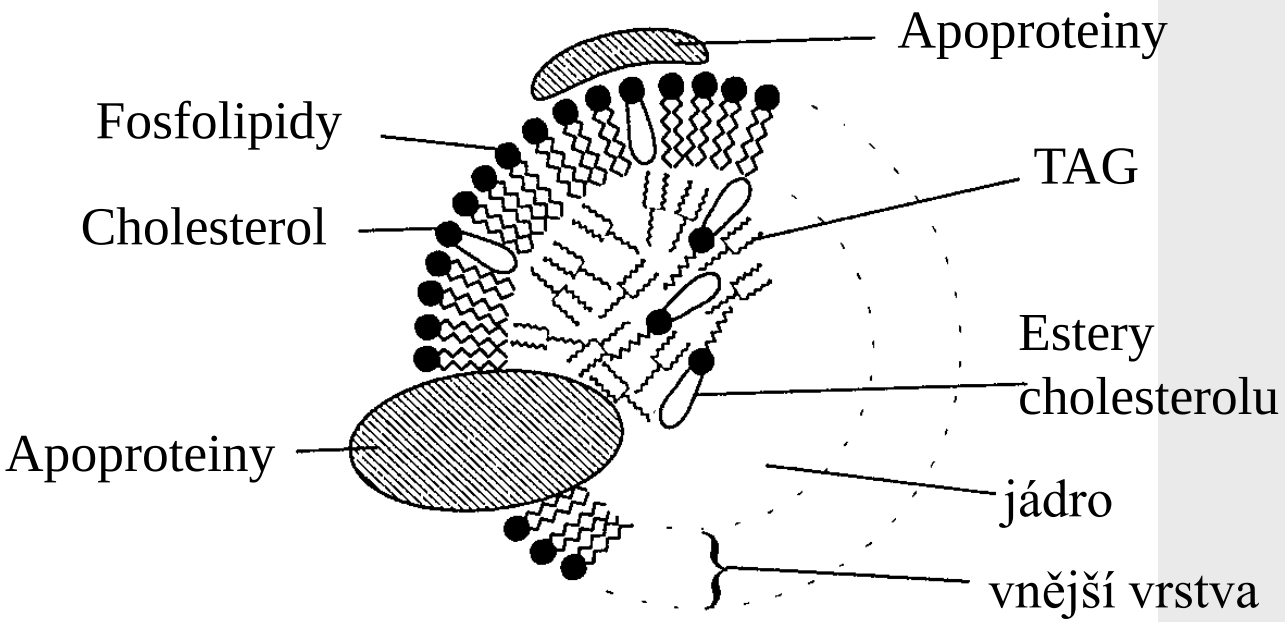
- Vazba na specifické proteiny (mastné kyseliny na albumin)
- Tvorba makromolekulárních komplexů

lipidy + apolipoproteiny = lipoproteiny

II. Zásobní lipidy a v buněčných membránách

Lipoproteiny jsou transportní formou nepolárních lipidů v krvi

Obecná struktura lipoproteinu



Odběr krve

- **pacient lačný 9-12h**
- 2-3 dny má být vynechán alkohol,
- Krev odebrána bez dlouhé venostázy,
- Pacient má dodržovat alespoň 2 týdny stávající životní styl
- Vyšetření z krevního séra a plazmy je rovnocenné

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

Cholesterol	**ID-GC/MS, ID-LC/MS** (Cholesterol $^{13}C2$)
Triacylglyceroly	**ID-GC/MS** (Tripalmitin $^{13}C3$)
HDL cholesterol	**UC a kvantifikace (CDC)**
LDL cholesterol	**UC a kvantifikace (CDC)**

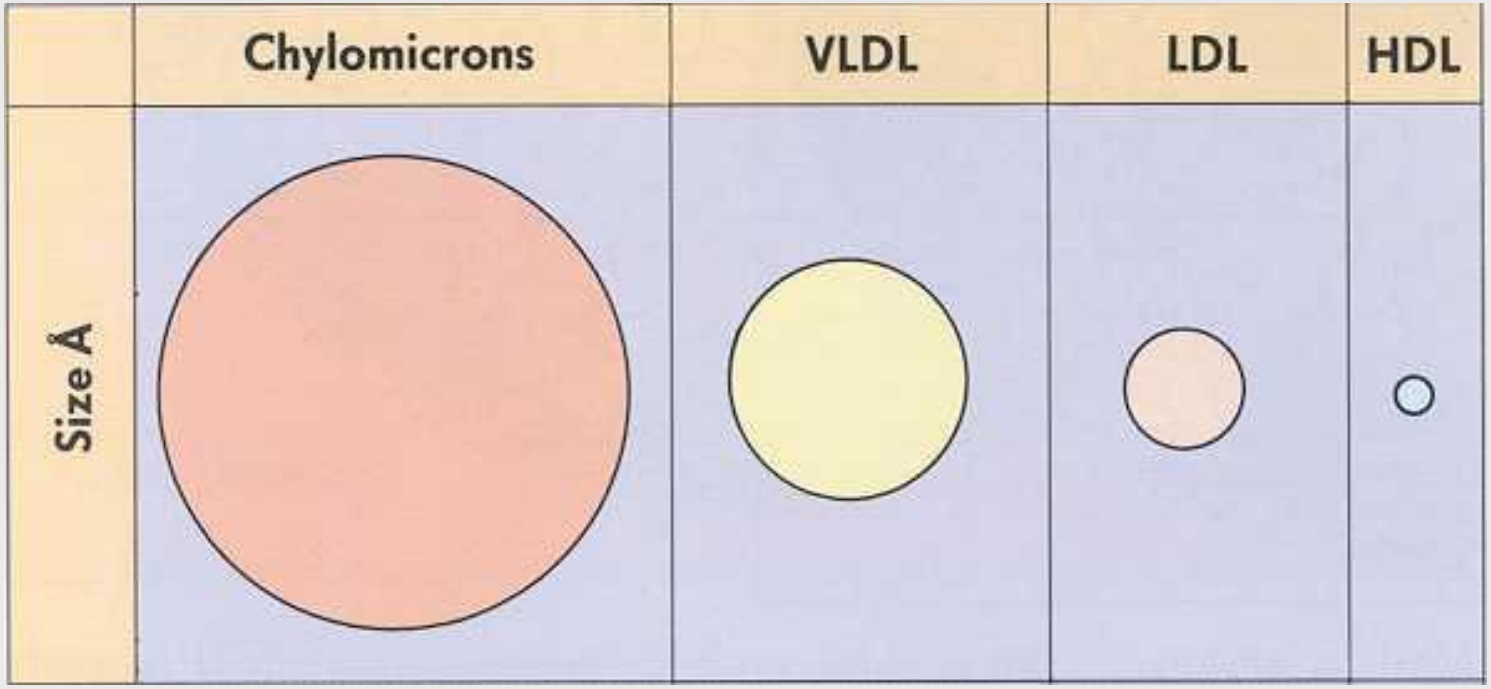
Referenční metody

ApoAI	není definována (návrh HPLC/MS)
ApoB	není definována
Lp(a)	není definována

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
- prostřednictví 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

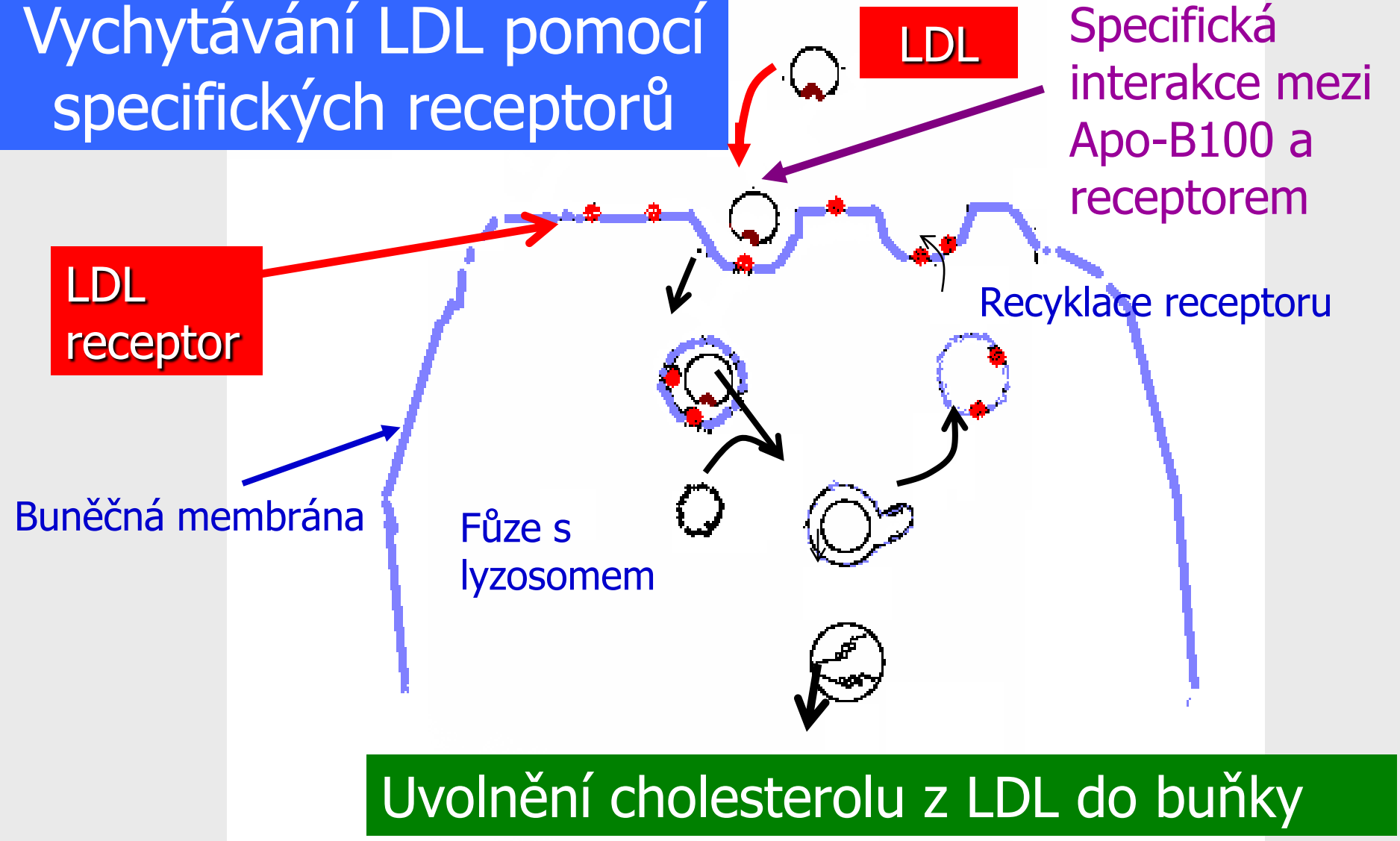
LDL

- vznikají z VLDL a IDL

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



Uvolnění cholesterolu z LDL do buňky

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_1 – HDL_3), které se liší velikostí a obsahem lipidů

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

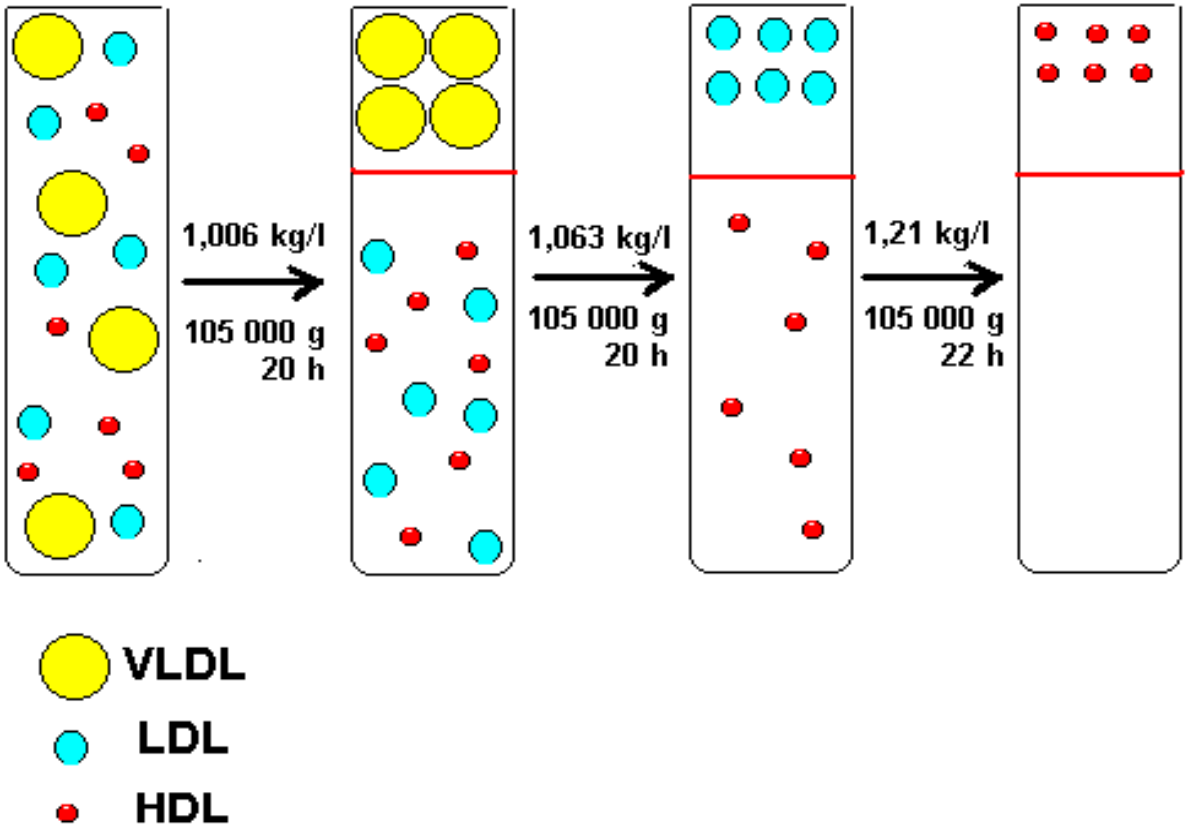
Problémy s kvantitativním stanovením Lp(a)

- Neexistuje primární referenční materiál
- Sekundární kalibrátor (2003 IFCC SRM 2B)
- Výsledky v nmol/l místo g/l (?)
- Nejednotnost protilátek
- Problémy v preanalytické fázi

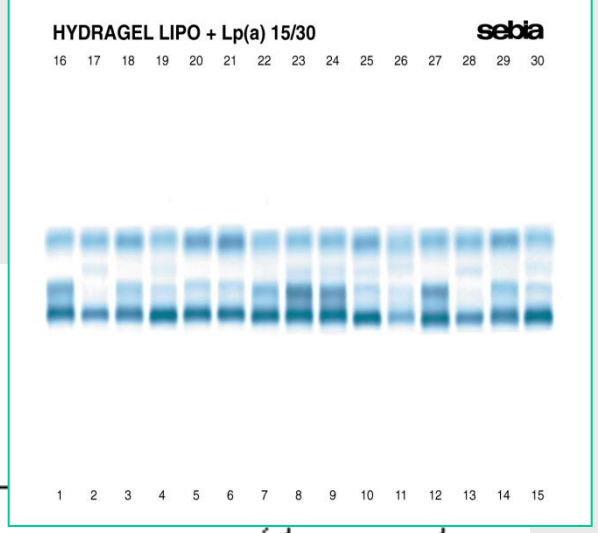
MEZI LIPOPROTEINY PROBÍHÁ VÝMĚNA LIPIDŮ I PROTEINŮ

Stanovení lipoproteinů

1) ULTRACENTRIFUGACE

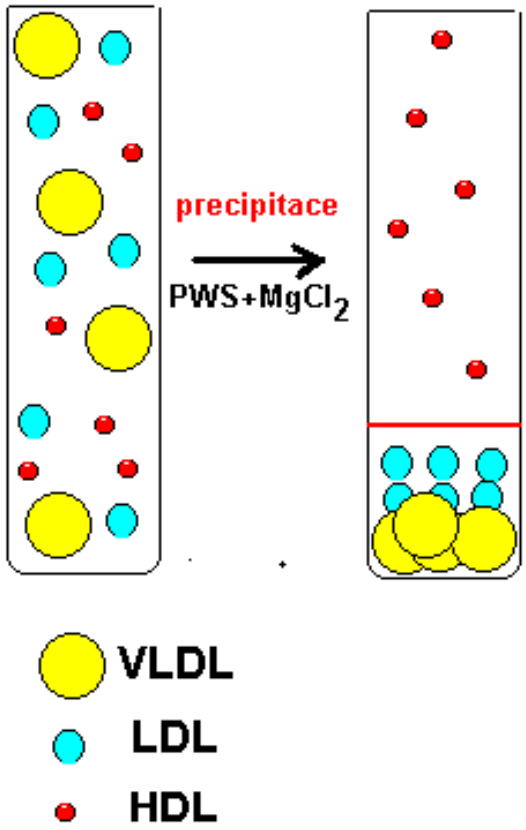


2) ELEKTROFORÉZA



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

3) SELEKTIVNÍ PRECIPITACE



4) IMUNOSEPARACE

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

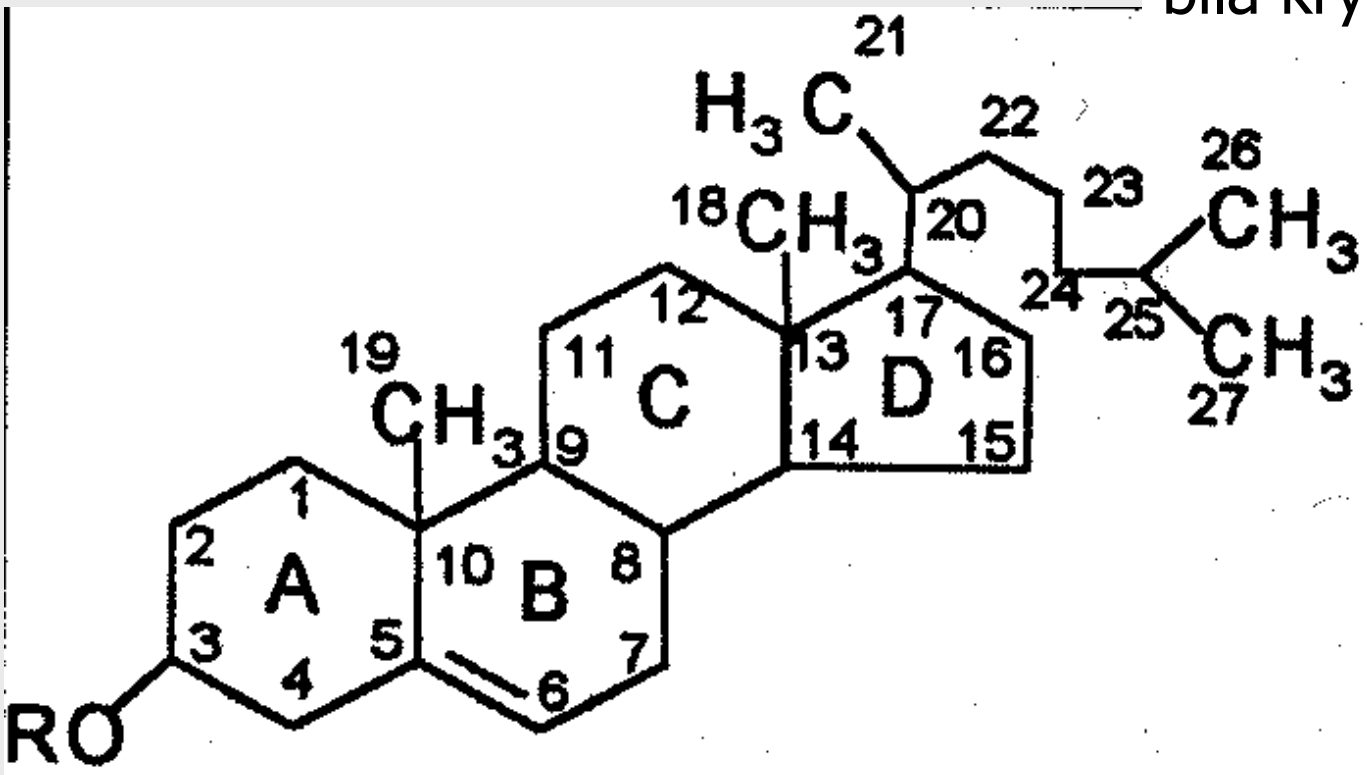
2) IMUNONEFELOMETRIE

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

Apo AI	Dmax (SEKK)	21 %
	TMU teor.	9,1%
Apo B	Dmax (SEKK)	21 %
	TMU teor.	11,6 %

Cholesterol

bílá krystalická látka



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

R = acyl (estery cholesterolu)

Cholesterol celkový =

Cholesterol +Cholesterol esterifikovaný

Cholesterol

2. Enzymové stanovení **(CHOD-PAP)**

- Hydrolýza esterů cholesterolu
  (CHE, cholesterolesterasa)
- Oxidace cholesterolu
  (CHOD, cholesteroloxidasa)
- Barevná reakce (oxidační kopulace)

  (POD, peroxidasa + chromogen, Trinderova reakce)

  Dmax (SEKK) 8,5%

  TMU teor. 8,5%

estery cholesterolu + $H_2O \leftrightarrow$ cholesterol + mastné kyseliny (CHE)

cholesterol + $O_2 \leftrightarrow$ Δ^4-cholesten-3-on + H_2O_2 (CHOD)

H_2O_2 + chromogen $\leftrightarrow$ H_2O_2 + barvivo (POD)

H_2O_2 + 4-aminoantipyrin + derivát fenolu $\leftrightarrow$ chinoniminové barvivo + 4 H_2O

Požadavky na analytickou kvalitu měření

Mezilehlá preciznost*	CV < 2,7 %
Pravdivost (bias)*	b < 4,0 %
Celková chyba*	TE < 8,5 %
Metrologická návaznost	na referenční metodu

Intraindividuální biologická variabilita	5,4	Preciznost odvozená z biologických variabilit	2,7
Interindividuální biologická variabilita	15,2	Pravdivost odvozená z biologických variabilit	4,0
Celková biologická variabilita		Celková chyba odvozená z biologických variabilit	8,5

HDL cholesterol

2. HOMOGENNÍ (přímé) metody

a) Imunoseparace (Wako)

(protilátky proti lidským ß-lipoproteinům

b) Maskování (Daiichi)

(polyanionové polymery)

c) Modifikované enzymy a maskování (Kyowa)

(enzymy modifikované PEGem + sulfáty cyklodextrinu)

Dmax (SEKK)	15 %
TMU teor.	11,1 %

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

Dmax (SEKK)	15 %
TMU teor.	13,6 %

b) metody s odstraněním non-LDL částic

- Přidání činidla 1

LDL + ochranné činidlo → „chráněné“ LDL

HDL, VLDL, chylomikrony → cholestenon + H_2O_2

(CHO, CHE)

H_2O_2 → H_2O

(kataláza)

- Přidání činidla 2

LDL + uvolňovací činidlo → LDL

LDL → cholestenon + H_2O_2

(CHO, CHE)

H_2O_2 + chromogen → H_2O + zbarvení

(peroxidáza)

Triacylglyceroly

Triacylglyceroly = estery glycerolu

Problémy při stanovení:

- volný glycerol
- diacylglyceroly
- monoacylglyceroly

Odběr krve musí být nalačno (12 až 14h)

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)

Dmax (SEKK)	15 %
TMU teor.	28 %

triacylglyceroly + $3H_2O$ ↔ glycerol + 3 mastné kyseliny

LIPASA

glycerol + ATP ↔ glycerol-3-fosfát + ADP

GLYCEROLKINASA (GK)

glycerol-3-fosfát **+ O_2** ↔ dihydroxyacetonfosfát **+** H_2O_2

GLYCEROLFOSFÁTOXIDASA (GPO)

2 H_2O_2 + 4-aminoantipyrin + derivát fenolu ↔ chinoniminové barvivo + 4 H_2O

PEROXIDASA (POD)

glycerol + ATP $\leftrightarrow$ glycerol-3-fosfát + ADP

GLYCEROLKINASA (GK)

ADP + fosfoenolpyruvát $\leftrightarrow$ ATP + pyruvát

PYRUVÁTKINASA (PK)

pyruvát + NADH $+H^+ \leftrightarrow$ laktát + NAD^+

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	**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**