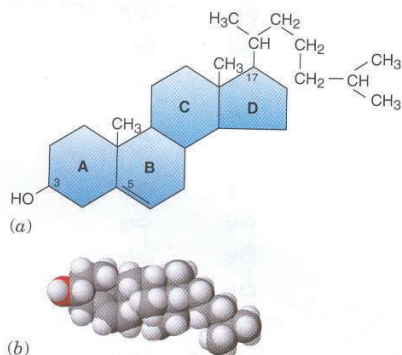


LIPIDY

① Cholesterol



Obrázek č. 1. Převzato z *Textbook of Biochemistry T.M. Devlin a kol, 2006.*

Klinický význam:

Cholesterol (obrázek č.1) stanovujeme „celkový“ – suma cholesterolu a jeho esterů. 60-70% cholesterolu v séru je esterifikováno.

↑ koncentrace: významný rizikový faktor pro vznik aterosklerosy, objevuje se u nefrotického syndromu a hypothyreosy

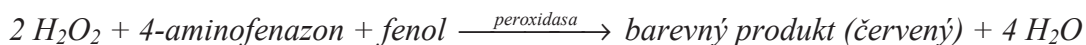
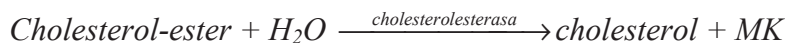
Orientační referenční hodnoty (sérum):

3,5- 5,2 mmol/l (žádoucí hodnoty)
5,2-6,2 mmol/l (hraniční koncentrace)
nad 6,2 mmol/l (zvýšené riziko)

Možnosti stanovení:

- **Enzymové metody**

Hydrolýza může být provedena klasicky pomocí roztoku hydroxidu za zvýšené teploty nebo pomocí enzymu cholesterolesterasy:



- Chromatografické metody: zde je nutná úprava vzorku před vlastní analýzou. (hydrolýza, extrakce, derivatizace. Určeno pro rozlišení esterů cholesterolu.

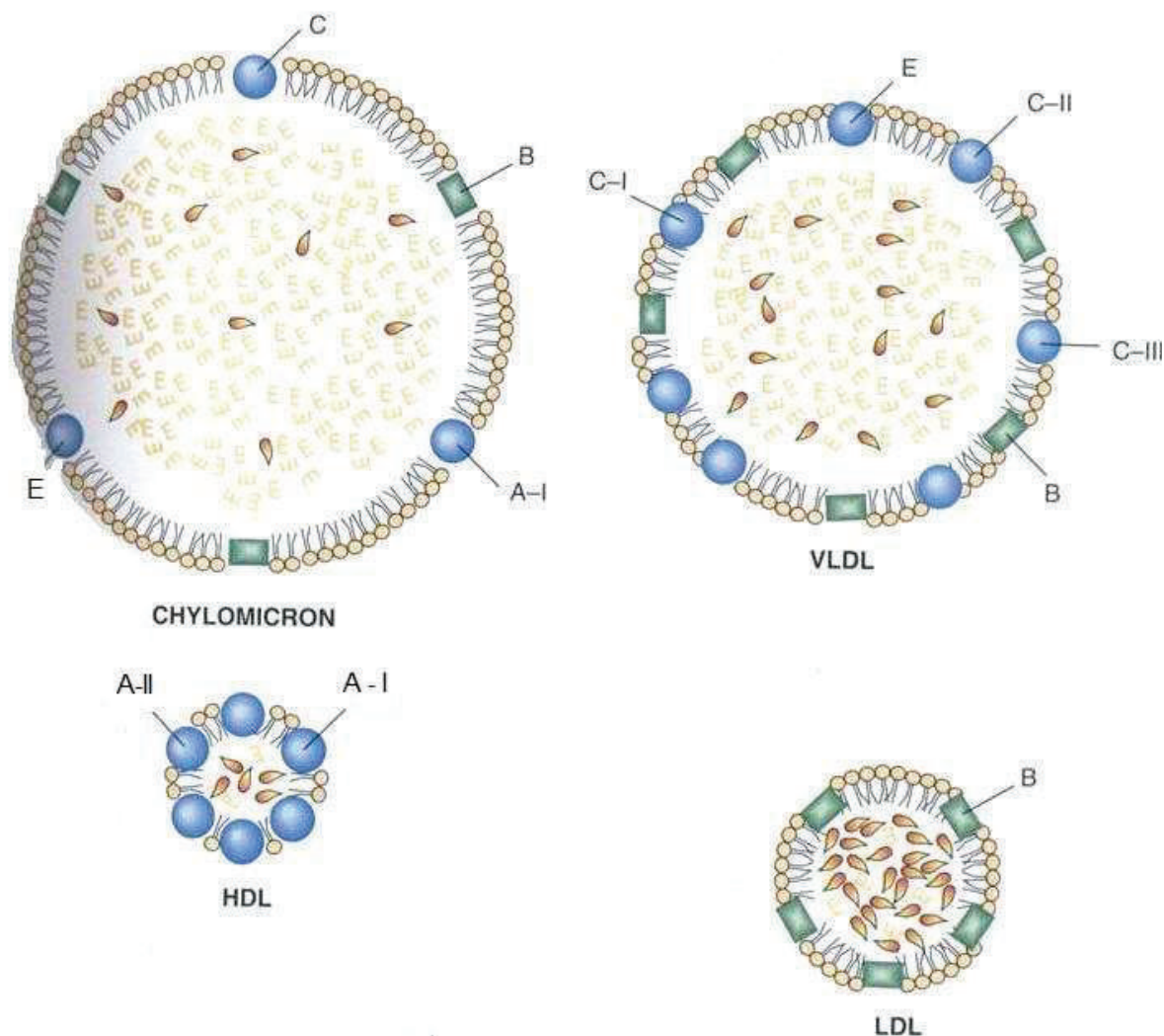
- Hmotnostní spektrometrie



- Chemické metody: cholesterol reaguje s kyselinou sírovou v bezvodém prostředí kyseliny octové a anhydridu kyseliny octové za vzniku modrozelených nenasycených sloučenin. Různé modifikace. Chemické metody se již téměř nepoužívají.

Lipoproteinové částice a jejich metabolismus

Lipoproteinové částice dělíme podle velikosti a hustoty (obsahu bílkovin a lipidů) na VLDL – (very low-density lipoproteins) – lipoproteiny o velmi nízké hustotě, IDL – (intermediate-density lipoproteins) - lipoproteiny o střední hustotě, LDL – (low-density lipoproteins) - lipoproteiny o nízké hustotě, HDL – (high-density lipoproteins) – lipoproteiny o vysoké hustotě (obrázek č.2). Metabolismus jednotlivých lipoproteinových částic je znázorněn na obrázku č.3.

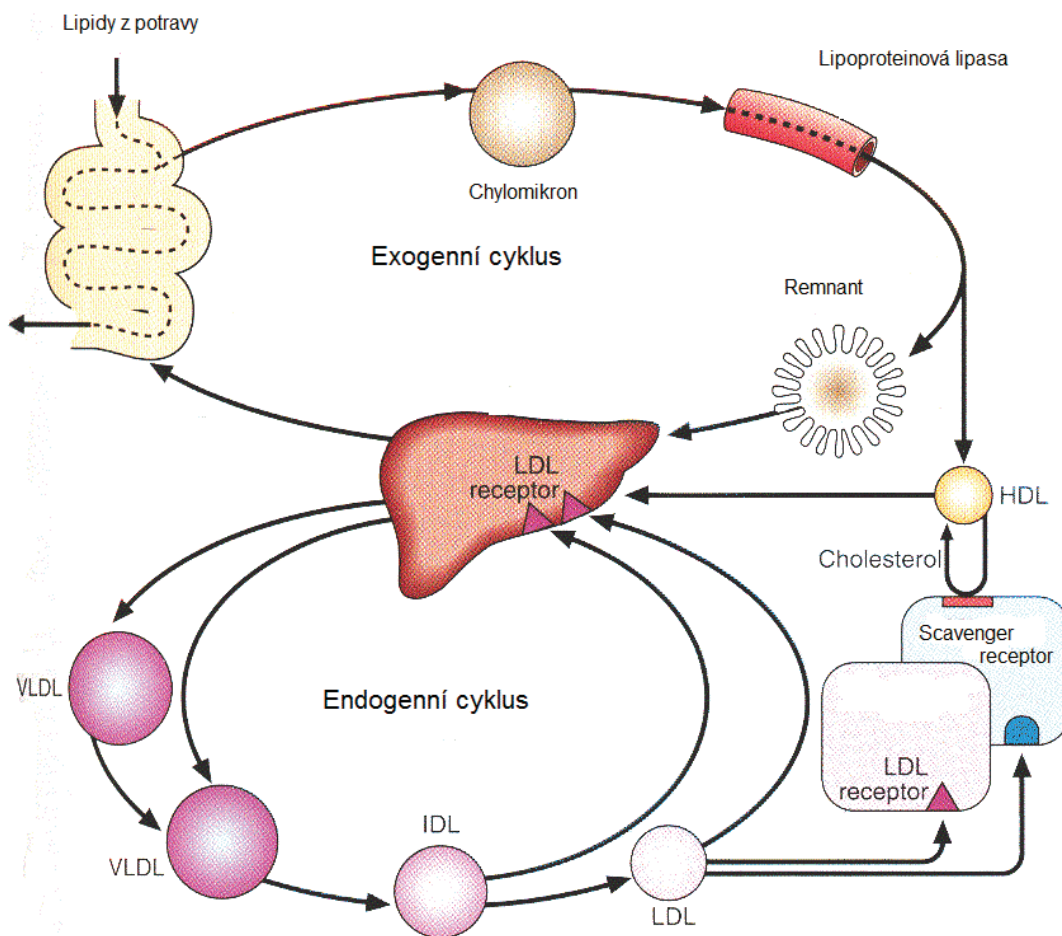


Obrázek č. 2. Převzato z *Textbook of Biochemistry T.M. Devlin a kol, 2006.*



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky



Obrázek č. 3. Upraveno dle *Clinical Biochemistry, An Illustrated Colour Text, 5 th edition, Gaw A a kol., 2008.*

② HDL cholesterol

Klinický význam:

Neaterogenní lipoproteinová částice, čím ↓ koncentrace, tím ↑ riziko vzniku aterosklerozy.

Orientační referenční hodnoty (sérum):

Referenční hodnoty (mmol/l)	muži	ženy
Prognosticky příznivé	nad 1,42	nad 1,68
Standardní riziko	0,90-1,42	1,16-1,68
Zvýšené riziko	pod 0,90	pod 1,16



Možnosti stanovení:

Pro stanovení cholesterolu v HDL částicích je třeba tyto částice nejprve odseparovat od ostatních lipoproteinových částic krevního séra. Poté následuje stejný postup jako pro stanovení celkového cholesterolu.

- **Srážecí metody.**

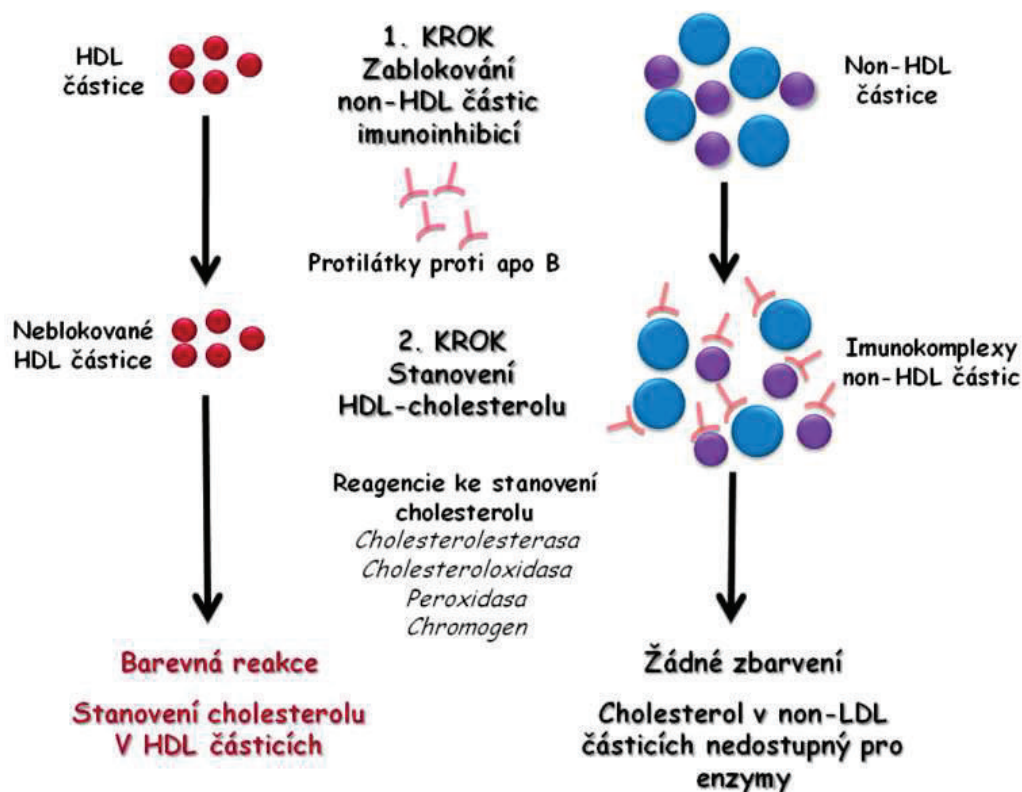
Přidáním precipitačního činidla se vysrážejí chylomikrony, VLDL a LDL částice. Použitelná precipitační činidla: kyselina fosfowolframová + $MgCl_2$, heparin + $MnCl_2$. Zastaralé.

- **Přímá metoda.**

Využívá zjištění, že enzymy cholesterolesterasa a cholesteroxidasa přeměňují v prostředí polyethylenglykolu, dextransulfátu a Mg^{2+} rychleji cholesterol z HDL než z ostatních lipoproteinů.

- **Vyvázení non-HDL lipoproteinů pomocí protilátek.**

Využívá blokace non-HDL částic v imunokomplexech, které vznikly reakcí s protilátkami proti Apo B (obrázek č. 4).



Obrázek č. 4. Upraveno dle www.wikiskripta.eu.

Aterogenní index

Pokud jsme učili celkový cholesterol a HDL cholesterol, můžeme vypočítat aterogenní index, např. podle Klimova:

$$\text{Index aterogenity (Ai)} = \frac{\text{celkový cholesterol} - \text{HDL cholesterol}}{\text{HDL cholesterol}}$$

Prognosticky příznivé	Standardní riziko	Zvýšené riziko
< než 3	3 - 4	> než 4

③ LDL cholesterol

Klinický význam:

Do určité míry platí, že čím ↑ koncentrace, tím vyšší riziko vzniku aterosklerosy.

Možnosti stanovení:

- Precipitační metody:
Precipitační činidla: (polyvinylsulfát, dextransulfát), vyprecipituje se LDL a měří se rozdíl mezi obsahem cholesterolu před a po precipitaci.
- Přímé stanovení: použitím polyklonálních protilátek proti HDL a VLDL vázané na polystyrenové latexové částice, po centrifugaci se v supernatantu stanoví cholesterol pouze v částicích LDL.
- Stanovení **výpočtem**: např. dle Friedewalda

$$\text{LDL cholesterol} = \text{celkový cholesterol} - \text{HDL cholesterol} - 0,4545 \cdot \text{triacylglyceroly}$$

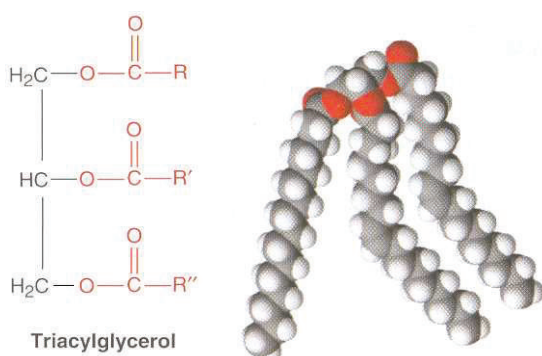
Orientační referenční hodnoty (sérum):

do 3,9 mmol/l (prognosticky příznivé)
3,9 – 4,9 mmol/l (standardní riziko)
nad 4,9 mmol/l (zvýšené riziko)



Univerzita
Pardubice

④ Triacylglyceroly (TAG)



Obrázek č. 5. Převzato z *Textbook of Biochemistry*
T.M. Devlin a kol, 2006.

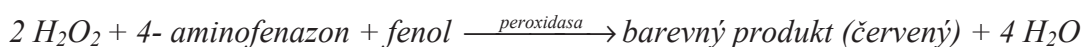
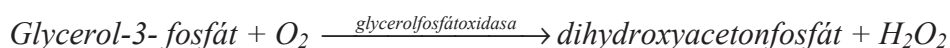
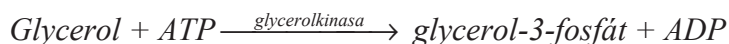
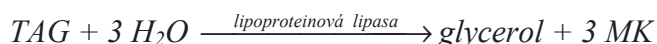
Klinický význam:

↑ koncentrace – rizikový faktor vzniku aterosklerózy, nacházíme ji u mnoha typů hyperlipoproteinémií, nefrotického syndromu, diabetu, alkoholismu, obezity, jaterních onemocněních.

Orientační referenční hodnoty (sérum): do 2,0 mmol/l

Možnosti stanovení:

- **Enzymové metody:**



- **Extrakčně-fotometrické metody:**

Nejprve se TAG ze séra vyextrahují organickými rozpouštědly (heptan – zředěná kyselina sírová), po centrifugaci se v supernatantu rozštěpí pomocí roztoku KOH za zvýšené teploty a uvolněný glycerol se oxiduje kyselinou jodistou na formaldehyd. Formaldehyd se potom stanoví reakcí s acetylacetonem a amoníky ionty, při které vzniká žluté zbarvení dihydrolutidinového derivátu.

- **Chromatografické metody:**

Plynová chromatografie, před použitím nutná úprava vzorku. Tenkovrstvá chromatografie.



⑤ Apolipoproteiny:

Specifické bílkoviny lipoproteinových částic. Hlavní funkce je regulace a kontrola metabolismu lipoproteinů, zprostředkovávají vazbu lipoproteinových částic na specifické receptory.

Jednotlivé apolipoproteiny se označují velkými tiskacími písmeny (ApoA), polypeptidové řetězce římskými číslicemi (ApoA - I, ApoA- II).

Klinický význam:

Stanovením ApoA-I a ApoB lze dobře identifikovat osoby ohrožené komplikacemi aterosklerosy.

Orientační referenční hodnoty (sérum):

ApoA-I.....1,2-2,0 g/l

ApoA-II.....0,3-0,4 g/l

ApoB.....0,5-1,3 g/l

Metody stanovení:

- Imunochemické metody – metody založené na reakci mezi antigenem a protilátkou, jednoduchá imunodifúze (vhodná pro ApoA – I a Apo – II), elektroimunodifúze (současné stanovení ApoB a Apo –I), imunoturbidimetrie a imunonefelometrie. Dále pak enzymoimunoanalýza a radioimunoanalýza.
- Izoelektrická fokusace v polyakrylamidovém gelu – technika sloužící pro podrobnější stanovení jednotlivých forem apolipoproteinů. Vlastní dělení probíhá v gradientu pH. Vhodné pro rozdělení ApoA, ApoC a ApoE.
- Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu – dělení probíhá při konstantním pH v gelu obsahujícím většinou močovinu.

Použitá literatura:

Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations, TM Devlin a kol, 2006

Clinical Biochemistry, 8 th edition, Beckett G a kol., 2010.

Clinical Biochemistry, An Illustrated Colour Text, 5 th edition, Gaw A a kol., 2008.

Klinická biochemie, Racek J a kol. 2006.

Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii, Doležalová V a kol., 1995.



Univerzita
Pardubice

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky