

Biochemické vyšetření u hyperlipoproteinémie

Problematika poruch lipidového metabolismu se v posledních letech dostává do popředí zájmu především v souvislosti s prevencí a léčbou kardiovaskulárních onemocnění. Podstatnou úlohu v diagnostice hyperlipoproteinémií a sledování terapie mají biochemická vyšetření.

Základním laboratorním vyšetřením je stanovení celkového cholesterolu a triacylglycerolů v séru (plazmě), dále stanovení LDL- a HDL-cholesterolu.

K dalším již **specializovanějším vyšetřením** patří stanovení typických apoproteinů **apoA-I (HDL)** a **apoB-100 (LDL)**, popř. i lipoproteinu(a) a elektroforéza lipoproteinů, jejíž význam se snižuje. Postupně se rozvíjí i DNA diagnostika, postihující příčiny některých HLP.

Laboratorní diagnostika poruch lipidového metabolismu se musí opírat o vyšetření krevních lipidů alespoň ze dvou odběrů krve v rozmezí 2–8 týdnů, za běžného životního stylu. U jednotlivých parametrů se zjistí rozdíly a pokud jsou nižší než přípustné hodnoty, vypočte se aritmetický průměr pro každý analyt. V případě překročení kritického rozdílu mezi 2 po sobě jdoucími analýzami se provede třetí vyšetření.

Kritické rozdíly pro analyty lipidového metabolismu

Analyt	Kritický rozdíl [%]
Celkový cholesterol	> 20
LDL-cholesterol	> 25
HDL-cholesterol	> 25
Triacylglyceroly	> 65

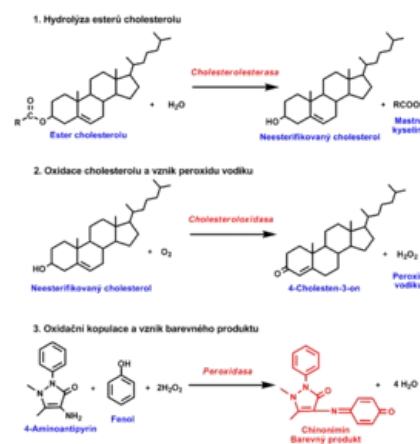
Je třeba rovněž vzít v úvahu, že vyšetření lipidového metabolismu je významně ovlivněno **životním stylem** (dietní návyky, pohybová aktivita, tělesná hmotnost), **farmakoterapií** (hormonální antikoncepce, hormonální substituční léčba ad.) a **probíhajícím akutním nebo nekompensovaným onemocněním**. Proto vyšetření krevních lipidů nemá být prováděno tehdy, kdy lze předpokládat, že výsledek nebude vypovídat o situaci za běžného životního stylu (krátce po dovolené, při hospitalizaci z jiných důvodů, akutním diabetes mellitus, v těhotenství a půl roku po něm atd.).

Stanovení celkového cholesterolu

Princip

Cholesterol je v krevní plazmě transportován jako součást lipoproteinů, z největší části ve frakci LDL, méně v HDL a VLDL. Z tohoto cholesterolu jsou přibližně dvě třetiny esterifikovány vyššími mastnými kyselinami, zbytek je neesterifikován.

- Běžně je v séru (plazmě) stanovován **celkový cholesterol**. Proto vlastnímu stanovení celkového cholesterolu předchází hydrolýza esterů cholesterolu na volný cholesterol a mastné kyseliny pomocí enzymu cholesterolesterázy (CE).
- Následuje oxidace neesterifikovaného cholesterolu na 4-cholesten-3-on za současného vzniku peroxidu vodíku v reakci katalyzované cholesteroxidázou (CHOD).
- Poslední reakce využívá peroxidu vodíku k oxidační kopulaci 4-aminoantipyrinu a fenolu v přítomnosti dalšího enzymu peroxidázy (POD). Vzniká barevný produkt, jehož absorbance je úměrná množství cholesterolu (obr. 2).



Obr. 2 Stanovení celkového cholesterolu

Hodnocení

- Se stoupající koncentrací celkového cholesterolu se **zvýšuje riziko aterosklerózy**. Podle českých a evropských doporučení má být koncentrace celkového cholesterolu **< 5,0 mmol/l**. Celkový cholesterol by měl být stanoven u všech osob nad 18 let v rámci prevence. Vyšetření by mělo být i v případě normálního výsledku t.j. do 5,0 mmol/l opakováno za 5 let.
- Pokud je koncentrace vyšší a dále u nemocných s ischemickou chorobou srdeční a dalších rizikových osob, přistupujeme k podrobnějšímu vyšetření lipidového spektra stanovením LDL- a HDL cholesterolu a triacylglycerolů.
- U pacientů se zvýšeným rizikem kardiovaskulárního onemocnění (např. diabetici) by celkový cholesterol měl být nižší < 4,5 mmol/l a u osob s již manifestním kardiovaskulárním onemocněním dokonce < 4,0 mmol/l.
- Zvýšená koncentrace cholesterolu se dále často nachází u diabetiků nebo u hypotyreózy. Ke snížení koncentrace celkového cholesterolu dochází např. u pokročilých jaterních cirhóz nebo hypertyreózy nebo

malnutrici.

- Je markerem pro celkovou mortalitu a pro KVO rizikovým faktorem. Vztah cholesterolu k celkové mortalitě je nelineární, má tvar písmene J nebo U, který lze vysvětlit mechanismem reverzní kauzality.

Hodnoticí meze

Koncentrace celkového cholesterolu v séru (S-cholesterol celkový): **2,9-5,0 mmol/l**.

Stanovení LDL-cholesterolu (LDL-C)

Princip

Koncentraci LDL-cholesterolu lze zjistit **nepřímo** pomocí výpočtu nebo **přímou** analýzou.

Nepřímé stanovení LDL-C

- Při nepřímém stanovení LDL-C se používá tzv. **Friedewaldův vzorec**.

$$\text{LDL-cholesterol} = \text{celkový cholesterol} - \text{HDL-cholesterol} - \text{TG}/2,2$$

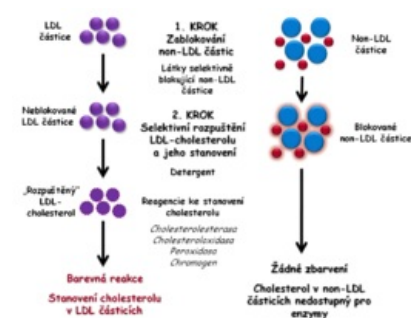
- Vychází z předpokladu, že cholesterol v séru je obsažen ve frakci HDL, LDL a VLDL. Výpočet vyžaduje měření tří různých analytů – celkového cholesterolu, HDL-cholesterolu a triacylglycerolů. Tím se zvyšuje možnost analytických chyb. Celkový cholesterol a HDL-cholesterol stanovujeme přímo. Zjištění cholesterolu ve VLDL je obtížné. Určujeme ho na základě předpokladu, že molární poměr cholesterolu ve VLDL činí průměrně 45 % obsahu celkových triacylglycerolů; potom zlomek TG/2,2 představuje cholesterol ve VLDL částicích. Vzorec lze použít pouze za předpokladu, že hodnota triacylglycerolů není vyšší než 4,5 mmol/l, nesmějí být přítomna chylomikra.

Přímé stanovení LDL-C

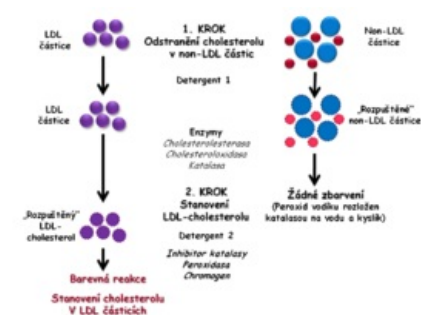
Do praxe se postupně zavádí přímé stanovení LDL-cholesterolu **homogenními metodami** bez nutnosti separačních kroků a centrifugace, jejichž výhodou je možnost automatizace. Zjednodušení analýzy bylo dosaženo použitím různých detergentů a dalších reagentů, které specificky blokují nebo rozpouštějí jednotlivé lipoproteinové frakce. Tímto způsobem se oddělí LDL částice, v nichž se v závěrečné fázi analýzy určí obsah cholesterolu.

Pro přímé stanovení LDL-C bylo vypracováno několik postupů. Analýza bývá rozdělena do dvou kroků.

- Jeden z postupů využívá různých detergentů a dalších látek k **selektivnímu zablokování cholesterolu v non-LDL částicích** (HDL, VLDL a chylomikrony), jejichž cholesterol se stává nedostupným pro působení enzymů používaných k jeho stanovení. V neblokovaných LDL-částicích je po uvolnění stanoven cholesterol enzymovou metodou popsanou u celkového cholesterolu pomocí reakcí cholesterolesterázy, cholesteroxidázy a peroxidázy (Obr. 3A).
- V jiné metodě je v první fázi pomocí detergentu uvolněn cholesterol z chylomikronů, VLDL a HDL. Uvolněný cholesterol je přeměněn pomocí enzymů až na 4-cholesten-3-on a peroxid vodíku. Peroxid vodíku vzniklý v této fázi není využit k tvorbě barevného produktu, neboť by interferoval v dalším kroku stanovení. Proto je rozložen katalázou na vodu a kyslík. Při této reakci se nevyvíjí zbarvení. Ve druhé fázi jiný detergent uvolní cholesterol z LDL a ten je poté stanoven podobně jako u celkového cholesterolu (Obr. 3B).



Obr. 3A Přímé stanovení LDL-cholesterolu



Obr. 3B Přímé stanovení LDL-cholesterolu

Existují i další metody pro stanovení přímého LDL-cholesterolu.

Hodnocení

- Zvýšená koncentrace LDL-cholesterolu se významně podílí **na rozvoji aterosklerózy**. Doporučená koncentrace LDL-cholesterolu je podle současných českých a evropských doporučení **< 3,0 mmol/l**.
- Pro pacienty se zvýšeným rizikem kardiovaskulárního onemocnění jsou doporučovány koncentrace LDL < 2,6 mmol/l a pro pacienty s již rozvinutým kardiovaskulárním onemocněním < 1,8 mmol/l.

Hodnoticí meze

LDL-cholesterol v séru: **1,2-3,0 mmol/l**

Stanovení HDL-cholesterolu (HDL-C)

Princip

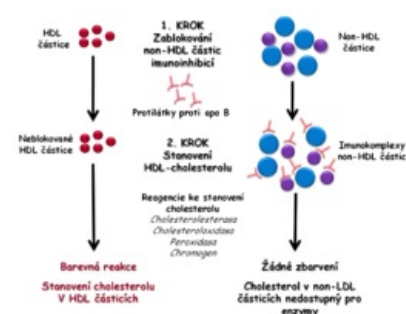
Starší metody pro stanovení HDL-C

Starší metody využívají postupy založené na stanovení cholesterolu v HDL částicích po odstranění non-HDL částic. Vysrážené lipoproteinové částice jsou odděleny centrifugací. V supernatantu je poté stanovena koncentrace cholesterolu v HDL částicích pomocí běžně používaných fotometrických metod.

Přímé stanovení HDL-C

Moderní snadno automatizovatelné metody využívají podobně jako je tomu u LDL-C přímého stanovení HDL-cholesterolu pomocí **homogenních metod** bez precipitace a centrifugace. Pro přímé stanovení HDL-C bylo vypracováno několik postupů. Analýza bývá rozdělena do dvou kroků.

- V prvním kroku jsou blokovány všechny non-HDL částice (VLDL, LDL, chylomikrony). Zablokováním non-HDL částic se znemožní reakce v nich obsaženého cholesterolu s enzymy používanými k jeho stanovení. Blokáce může být dosaženo imunoinhibicí pomocí protilátek namířených proti apoB, který je součástí VLDL, LDL i chylomikronů. Protilátky vytvářejí s non-HDL rozpustné imunokomplexy. V dalším kroku detergent rozpustí HDL částice a pomocí enzymů cholesterolesterázy, cholesteroxidázy a peroxidázy je měřen cholesterol v HDL stejným způsobem jako při stanovení celkového cholesterolu, tj. pomocí enzymů (obr. 4A).

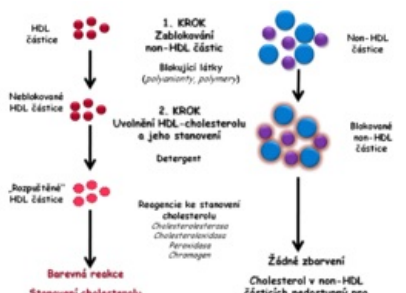


Obr.4A Přímé stanovení HDL-cholesterolu imunoinhibicí

- Další metoda používá k blokaci polyaniontů a polymerů, které se selektivně adsorbují na povrch non-HDL lipoproteinů. Ty jsou potom chráněny vůči detergentům, které uvolňují cholesterol obsažený pouze v HDL částicích. Druhý krok analýzy je analogický postupu popsanému u první metody (obr. 4B).

Hodnocení

- Koncentrace HDL-cholesterolu by měly být **> 1,0 mmol/l u mužů a > 1,2 mmol/l u žen**. Zvýšený HDL-C je považován za „**negativní rizikový**“ faktor rozvoje aterosklerózy a naopak hladiny nižší než 1,0 mmol/l jsou spojovány se zvýšeným rizikem aterosklerózy.
- Nízký HDL provází metabolický syndrom, nízkou tělesnou aktivitu, DM 2.typu, kuřáctví cigaret a konzumaci velkého množství sacharidů.



Obr.4B Přímé stanovení HDL-cholesterolu

Hodnoticí meze

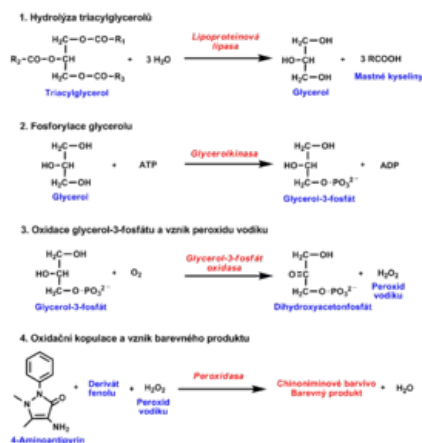
- HDL-cholesterol v séru (muži): **1,0-2,1 mmol/l**
- HDL-cholesterol v séru (ženy): **1,2-2,7 mmol/l**

Stanovení triacylglycerolů

Princip

Doporučené rutinní metody stanovení triacylglycerolů využívají několika enzymových reakcí.

- Lipoproteinová lipáza katalyzuje hydrolýzu triacylglycerolů na glycerol a mastné kyseliny.
- Uvolněný glycerol se převádí působením glycerolkinázy v přítomnosti ATP na glycerol-3-fosfát, který je pomocí glycerol-3-fosfát oxidázy oxidován na dihydroxyacetonfosfát.
- Současně vzniklý peroxid vodíku je využíván v další reakci katalyzované peroxidázou k oxidační kopulaci 4-aminoantipyrinu s derivátem fenolu. Vzniká chinoniminové barvivo, jehož absorbance se odečítá.



Obr.5 Stanovení triacylglycerolů

Hodnocení

- Zvýšená koncentrace triacylglycerolů je nezávislým rizikovým faktorem aterosklerózy. Česká a evropská doporučení považují za normální koncentraci triacylglycerolů v séru hodnotu **< 1,7 mmol/l**.
- Koncentrace TG > 1,7 mmol/l (nalačno) je považována za ukazatel zvýšeného kardiovaskulárního rizika. Vyšší triacylglyceroly bývají spojené se sníženými hladinami HDL a předpovídají vysoké koncentrace remnantů bohatých na cholesterol a malých hustých částic LDL typu B.
- Koncentrace triacylglycerolů se zvyšuje během 2 hodin po jídle a maxima dosahuje za 4-6 hodin, proto musí být krev na stanovení triacylglycerolů odebírána po 12-14hodinovém lačnění. Vzorky plazmy s koncentrací TG

vyšší než 3,4 mmol/l opaleskují, při hladinách TG nad 11,3 mmol/l jsou přítomny chylomikrony a plazma je mléčně zakalená.

- Při terapii se klade velký důraz na dietu s nízkým obsahem tuků a cukrů, na zvýšenou tělesnou aktivitu, dostatek antioxidantů v potravě a na celkovou hypolipidemickou léčbu.

Hodnoticí meze

Koncentrace triacylglycerolů v séru (fS-triacylglyceroly): **0,45-1,7 mmol/l**

Odvozené parametry lipidového metabolismu

Cílem těchto výpočtů je zpřesnit stanovení rizika, které vyplývá z naměřených hodnot krevních lipidů.

Aterogenní index

- Z naměřených hodnot týkajících se cholesterolu lze počítat různé aterogenní indexy. Doručován je index, který bere v úvahu vliv koncentrace celkového cholesterolu i HDL-C na riziko kardiovaskulárních onemocnění. Index zohledňuje fakt, že zvýšený HDL-C je „negativní rizikový faktor“, snižující riziko ischemické choroby srdeční (ICHS). Současné zvýšení celkového i HDL cholesterolu nemusí riziko ICHS zvyšovat.

$$\text{Celkový cholesterol/HDL-cholesterol}$$

Doporučená hodnota

Aterogenní index: **< 5,0**

Non-HDL-cholesterol

- Je využíván k odhadu rizika aterosklerózy v případech, kdy není možno vypočítat koncentraci LDL-C. Představuje cholesterol obsažený v potenciálně aterogenních lipoproteinových částicích (LDL, IDL, VLDL, zbytkové chylomikrony).

$$\text{Non-HDL-cholesterol (mmol/l)} = \text{celkový cholesterol (mmol/l)} - \text{HDL-cholesterol (mmol/l)}$$

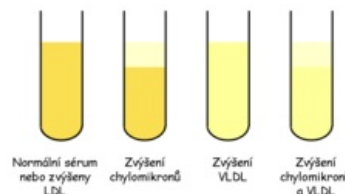
Doporučená hodnota

Non-HDL-cholesterol: **< 3,8 mmol/l**

Chylomikronový test

Princip:

- Měření koncentrace chylomikronů není běžně prováděno. Ve vzorcích odebraných po 12hodinovém lačnění by se neměly vyskytovat. Pro jejich přítomnost svědčí silná chylozita séra. K důkazu lze provést chylomikronový test, který spočívá v pozorování opalescentního až bílého prstence po 12hodinovém stání séra při 4 °C. Během této doby flotují eventuálně přítomné chylomikrony k hladině vzorku. Každé zdravé sérum má být po 12hodinovém lačnění úplně čiré.
- Vzhled séra při chylomikronovém testu může upozornit i na jiné poruchy v metabolismu lipoproteinů.



Obr. 6 Vzhled séra při chylomikronovém testu

Hodnocení

Vzhled	Změny v lipoproteinech
Čirý	normální sérum nebo zvýšeny LDL částice
Mléčně zkalená horní vrstva, sérum pod touto vrstvou je čiré	mléčně zkalená horní vrstva odpovídá chylomikronům, které během inkubace vyplavou na povrch
Difúzní zkalení celého vzorku (chylózní sérum)	zvýšeny VLDL částice, intenzita zákalu závisí na množství triacylglycerolů ve VLDL
Mléčně zkalená horní vrstva a difúzní zkalení infranatanu	zvýšeny chylomikrony a VLDL
Úzká krémovitá horní vrstva a difúzní zkalení infranatanu	zvýšení chylomikronových zbytků a IDL

Elektroforéza sérových lipoproteinů

Princip

- Lipoproteinové částice se dělí v elektrickém poli podle rozdílné velikosti povrchového náboje, v tomto případě podmíněného rozdílným množstvím bílkovin v jednotlivých frakcích. Využívá se především pro **průkaz**

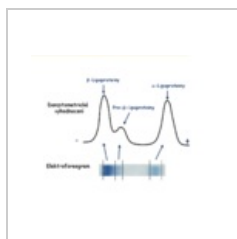
některých abnormálních lipoproteinů a při diagnostice **méně častých typů hyperlipoproteinémií** a pro detekci **aterogenního lipoproteinu Lp (a)**.

- Nejrychleji v oblasti α se pohybují nejmenší částice s nejvyšším obsahem proteinů **α -lipoproteiny (HDL)**. Na úrovni mezi α -2 a β jako **pre- β -lipoproteiny** migrují VLDL částice. LDL částice představují obvykle nejvýraznější frakci jako **β -lipoproteiny** v oblasti β -globulinů. **Chylomikrony**, pokud jsou přítomny v séru, zůstávají na startu, někdy mohou vytvářet pruh, který je viditelný od místa startu až k α oblasti. V poloze mezi α a β -lipoproteiny (HDL a LDL) se může objevit další frakce charakteristická pro lipoprotein (a) – Lp(a), který představuje rizikový faktor pro vznik aterosklerózy a kardiovaskulárních onemocnění.
- Provedení elektroforézy sérových lipoproteinů je obdobné jako u elektroforézy sérových bílkovin s tím rozdílem, že k barvení se používají lipofilní barviva např. Sudanová čerň. Elektroforéza lipoproteinů se obvykle provádí na agarosovém gelu, který umožňuje dobré oddělení pre- β -lipoproteinů.

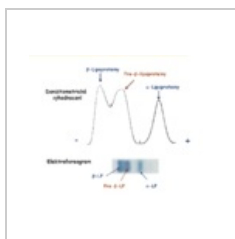
Hodnocení

- Elektroforeogram lze vyhodnotit **denzitometricky** při vlnové délce 580 nm. Výsledek se vyjadřuje v procentech optické hustoty pro jednotlivé frakce vzhledem k celkové barevné ploše. Stanovené hodnoty spolu s dalšími ukazateli (celkový cholesterol, triacylglyceroly) slouží k charakterizaci hyperlipoproteinémií (Obr. 7, 8, 9).
- V praxi se provádí také hodnocení pouze **vizuální**. Biologický nález se srovnává s referenčními hodnotami a výsledek se posuzuje ve smyslu zvýšení (snížení) jednotlivých frakcí.

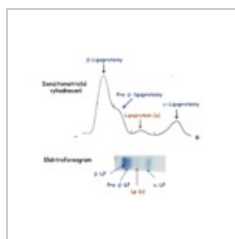
Referenční hodnoty	
α -lipoproteiny	23–46 %
pre- β -lipoproteiny	3–18 %
β -lipoproteiny	42–63 %



Obr. 7
Elektroforéza
lipoproteinů –
normální nález



Obr. 8
Elektroforéza
lipoproteinů se
zvýšenou pre- β -
frakcí



Obr. 9
Elektroforéza
lipoproteinů se
zvýšeným Lp(a)

Odkazy

Související články

- Dyslipidémie
- Lipoproteiny (klinika)
- Lipoproteiny
- Hypolipidemika
- Hypolipidemická léčba

Použitá literatura

- BURTIS, C.A. a E.R. ASHWOOD. *Tietz Textbook of Clinical Biochemistry*. 2. vydání. Philadelphia : W.B.Saunders Company, 1994. ISBN 0-7216-4472-4.
- ČEŠKA, R., et al. *Cholesterol a ateroskleróza, léčba dyslipidemií*. 1. vydání. Praha : Triton, 2005. ISBN 80-7254-738-0.
- MASOPUST, J. *Klinická biochemie. Požadování a hodnocení biochemických vyšetření I. a II. část*. 1. vydání. Praha : Karolinum, 1998. ISBN 80-7184-650-3.
- RACEK, J., et al. *Klinická biochemie*. První vydání. Praha : Galén – Karolinum, 1999. ISBN 80-7262-023-1.
- SCHNEIDERKA, P., et al. *Kapitoly z klinické biochemie*. 2. vydání. Praha : Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0678-X.
- SOŠKA, V. *Poruchy metabolismu lipidů. Diagnostika a léčba*. 1. vydání. Praha : Grada Publishing, 2001. ISBN 80-247-0234-7.

- ŠTERN, P., et al. *Obecná a klinická biochemie pro bakalářské obory studia..* 1. vydání. Praha : Karolinum, 2005. ISBN 978-80-246-1025-2.
- TÁBORSKÁ, E., et al. *Biochemie II – Praktická cvičení.* 3. vydání. Brno : Masarykova universita, 1999. ISBN 978-80-210-4516-3.
- ZIMA, T., et al. *Laboratorní diagnostika.* 1. vydání. Praha : Galén – Karolinum, 2002. ISBN 80-7262-201-3.

Externí odkazy

- Lipoproteiny (česká wikipedie)
- Lipoprotein (anglická wikipedie)
- FIALOVÁ, L. a M VEJRAŽKA. *Vybraná biochemická vyšetření u pacientů s poruchami metabolismus lipidů* [online]. ©2005. Poslední revize 20. 3. 2008, [cit. 7. 9. 2009]. <<https://el.lf1.cuni.cz>>.
- VEVERKOVÁ, H., et al. *Doporučení pro diagnostiku a léčbu dyslipidemií v dospělosti, vypracované výborem České společnosti pro aterosklerózu* [online]. ©2005. Poslední revize 9. 3. 2007, [cit. 7. 9. 2009]. <http://www.athero.cz/user_data/zpravodajstvi/obrazky/File/Doporuceni%20CSAT-07.pdf>.