Datum:	Jméno: Skupina:

CVIČENÍ 2: Vyšetření metabolismu lipidů a cholesterolu

Úvod

Základní lipidové vyšetření: TAG (triacylglyceroly), celkový cholesterol, HDL-cholesterol
⇒ výpočet LDL-cholesterol, non-HDL cholesterol.

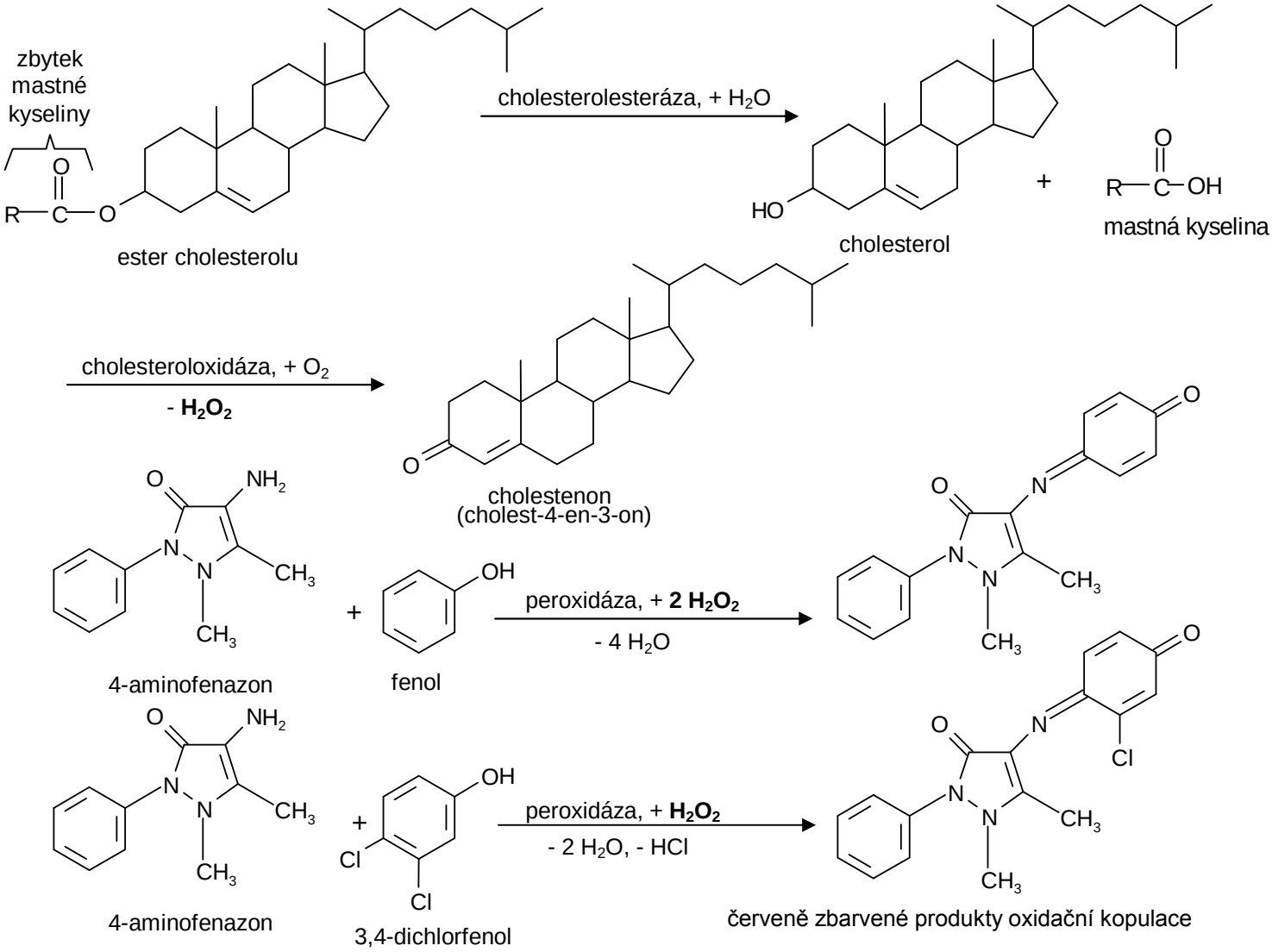
Základní poruchy: hyperlipidemie (hypercholesterolemie a/nebo hypertriacylglycerolemie),
hyperlipoproteinemie (často se ↓ HDL-cholesterolu - dyslipoproteinemie).

Laboratorní diagnostika: alespoň 2 vyšetření v rozmezí 2 - 8 týdnů za běžného životního stylu, počítají se rozdíly parametrů v % (viz cvičení 1), překročí-li rozdíl kritický rozdíl (CD) provede se 3. vyšetření, jinak aritmetický průměr

analyt	kritický rozdíl v %
Celkový cholesterol	> 20
LDL-cholesterol	> 25
HDL-cholesterol	> 25
Triacylglyceroly	> 65

2.1 Stanovení celkového cholesterolu v séru a krvi

2.1.1 Enzymové stanovení cholesterolu v séru



Provedení (viz skripta)

Výpočet koncentrace celkového cholesterolu v séru: $c_x = \frac{A_x}{A_{STD}} * c_{STD}$

A_x.....absorbance vzorku při 500 nm (bezrozměrné číslo)
A_{STD}..... absorbance standardu při 500 nm (bezrozměrné číslo)
c_x..... koncentrace cholesterolu ve vzorku (mmol dm^{-3} nebo-li mmol l^{-1})
c_{STD}.....koncentrace cholesterolu v kalibračním roztoku (mmol dm^{-3} nebo-li mmol l^{-1})

Výsledky:

Výpočet vzorek 1:

Výpočet vzorek 2:

Hodnocení

Rozhodovací analýza - porovnání zjištěné koncentrace s hraniční hodnotou sérové koncentrace cholesterolu 5 mmol l^{-1}. ↑ cholesterol (často u diabetu nebo hypotyreózy), ↓ cholesterol (pokročilé jaterní cirhózy nebo hypertyreóza), ref. inferval cholesterolu je 3,6 - 5,2 mmol l^{-1}. (dopiš hodnocení a závěr)

2.1.2 Stanovení cholesterolu analyzátorem Reflotron® v krvi

Stejný princip stanovení jako v 2.1.1. Všechny reakce probíhají v reakčním (diagnostickém, testovacím) proužku. Rozdíl je v chromogenním substrátu, který reaguje s peroxidem vodíku - je jím dimethylbenzidin.

Provedení (viz skripta)

Výsledek:

2.1.3 Stanovení cholesterolu analyzátorem Accutrend® v krvi

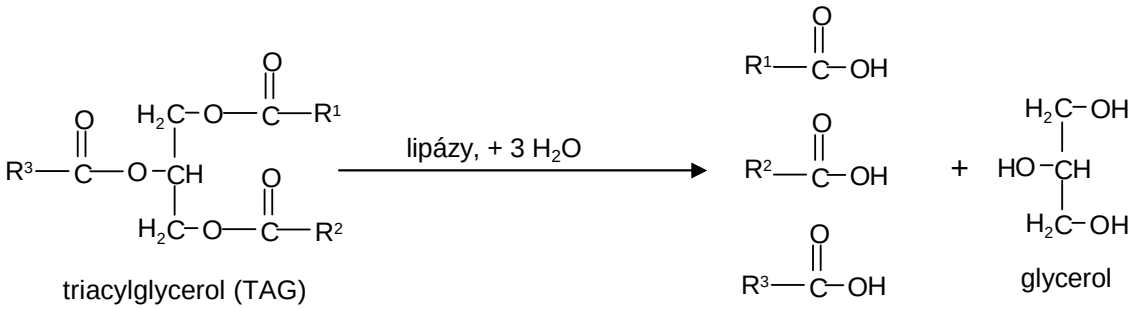
Všechny reakce probíhají v reakčním proužku. Analyzátor Accutrend® je v kapesním provedení na rozdíl od analyzátoru Reflotron®, který je ve stolním provedení.

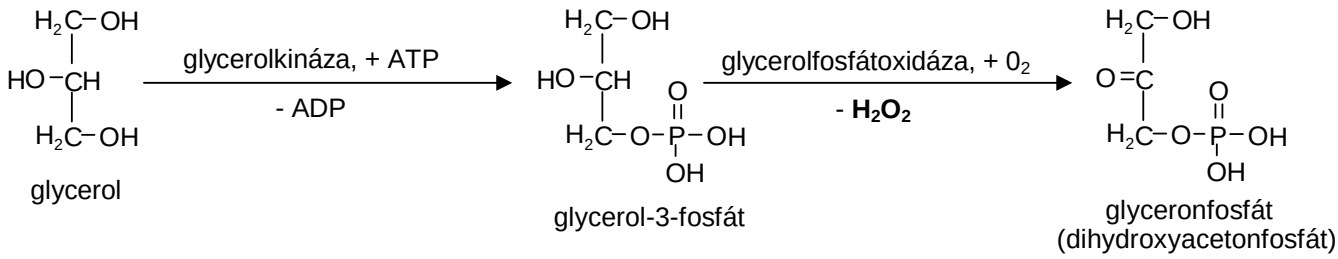
Provedení (viz skripta)

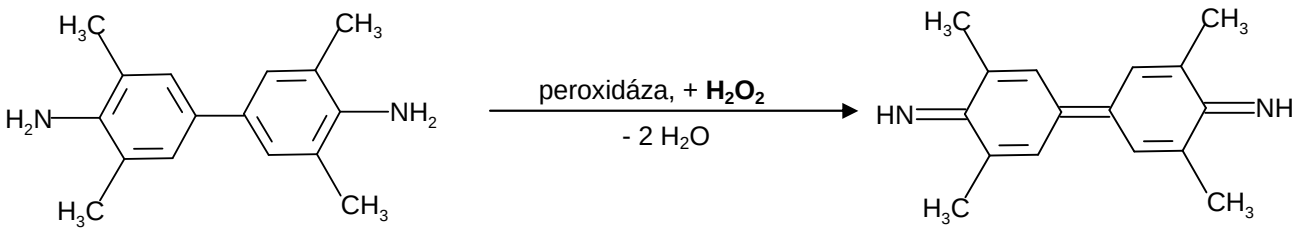
Výsledek:

2.2 Stanovení triacylglycerolů v krvi

Využívá se analyzátor Reflotron® s reakčními proužky na triacylglyceroly, ve kterých probíhají všechny reakce.







Provedení (viz skripta)

Výsledek:

Hodnocení

Rozhodovací analýza - porovnání zjištěné koncentrace s hraniční hodnotou sérové koncentrace triacylglycerolů 2 mmol l^{-1}. (dopiš hodnocení a závěr)

Pro terapeutickou rozvahu v klinické praxi postačí rozdělení hyperlipidemií do tří skupin:

I. hypercholesterolemie,
II. hypertriacylglycerolemie,
III. kombinované (smíšené) hyperlipidemie.

Patogenezi jednotlivých metabolických defektů postihuje genetická klasifikace hyperlipoproteinemií, která definuje jednotlivé nozologické jednotky.

Klasifikace hyperlipoproteinemií podle Fredricksona na základě elektroforézy lipoproteinů na typy I-V, je postupně opouštěna, ale v klinické praxi se stále používá **(LEDVINA, M., STOKLASOVÁ, A. a CERMAN, J. *Biochemie pro studující medicíny*. 1. vyd. díl 1. Praha : Karolinum, 2004. Kapitola 10.11, Metabolismus lipidů za patologických okolností, s. 207-209.)**.

2.3 Stanovení HDL-cholesterolu a výpočet LDL-cholesterolu

K séru se přidá kyselina fosfowolframová s $MgCl_2$ nebo heparin s $MnCl_2$, čímž se vysrážejí chylomikrony, VLDL a LDL. Sraženina se oddělí centrifugací, v supernatantu se stanoví cholesterol, tj. HDL-cholesterol (HDL_{Chol}).

Výpočet LDL-cholesterolu (LDL_{Chol}) pomocí Friedewaldova vzorce:

$LDL_{Chol} = Chol_{Celk} - TAG/2{,}2 - HDL_{Chol}$

$Chol_{Celk}$.. celkový cholesterol
TAG..... triacylglyceroly
všechny koncentrace jsou v mmol l^{-1}, význam ostatních symbolů viz výše

Vztah platí pro sérové koncentrace TAG nižší než 4,5 mmol l^{-1}.

Další odvozené parametry lipidového metabolismu

Index $Chol_{Celk}/HDL_{Chol}$
Non-HDL_{Chol} ($Non\text{-}HDL_{Chol} = Chol_{Celk} - HDL_{Chol}$)

Provedení
Vzhledem k časové náročnosti se úloha provede jen teoreticky. V následující tabulce jsou zadány hodnoty $Chol_{Celk}$, TAG a HDL_{Chol} pro pět pacientů. Dopočítej hodnoty LDL_{Chol}, Index $Chol_{Celk}/HDL_{Chol}$ a Non-HDL_{Chol}. Porovnej všechny hodnoty s hodnotami žádoucími (označ N, ↑, ↓). Ohodnoť riziko vzniku aterosklerózy u jednotlivých pacientů (pacienta s nejvyšším rizikem označ 1, s nižším rizikem 2 atd., pokud je riziko stejné označ ho stejným číslem).

		$Chol_{Celk}$ (mmol l^{-1})	LDL_{Chol} (mmol l^{-1})	TAG (mmol l^{-1})	HDL_{Chol} (mmol l^{-1})	Index $Chol_{Celk}/HDL_{Chol}$	Non-HDL_{Chol} (mmol l^{-1})
žádoucí hodnoty		< 5,0	< 3,0	< 2,0	> 1,0	< 5	< 3,8
	pořadí rizika vzniku ateroskleróz y						
Pacient 1		7,5		1,3	1,4		
Pacient 2		7,6		1,4	1,5		
Pacient 3		6,0		2,0	1,4		
Pacient 4		6,1		2,1	1,3		
Pacient 5		4,9		1,4	1,5		

2.4 Chylomikronový test

Chylomikrony by se neměly po 12 hodinovém lačnění v krvi vyskytovat. Pokud jsou přítomny je získané sérum chylózní (mléčně zakalené) a po 12 hodinovém skladování při 4 °C chylomikrony vystoupají (flotují) k hladině vzorku.

2.4 Elektroforéza lipoproteinů v séru

Provedení (viz skripta)

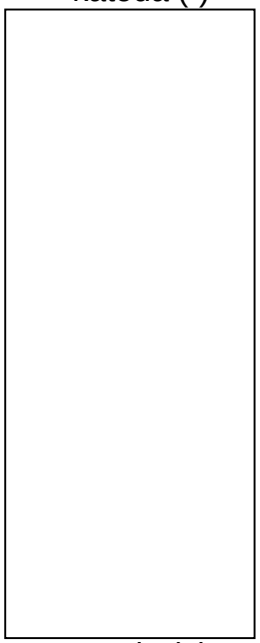
Dělení lipoproteinů na agarózovém gelu.
Elektroforetický pufr (Tris-barbitalový) je zásaditý (pH = 8,75) ⇒ lipoproteiny jsou záporně nabité a proto putují k anodě.
Detekce (barvení) roztokem Sudanové černě.

Hodnocení elektroforeogramu

Denzitometricky při 580 nm - určí se procento optické hustoty jednotlivých frakcí lipoproteinů vzhledem k celkové barevné ploše.

lipoprotein	referenční interval
α-lipoproteiny (HDL)	23-46 %
pre-β-lipoproteiny (VLDL)	3-18 %
β-lipoproteiny (LDL)	42-63 %

katoda (-)



anoda (+)

Obkresli do protokolu elektroforeogram. Označ jednotlivé frakce lipoproteinů a a vizuálně zhodnoť jejich zastoupení (označ N, ↑, ↓).

Problémy související s tímto tématem

4 1. U Pana J. (45 let) byla při preventivní kontrole zjištěna hladina cholesterolu 6,0 mmol l^{-1}. Po 8 týdnech bylo vyšetření opakováno a byla zjištěna hodnota 5,2 mmol l^{-1}. Hodnota kritického rozdílu (CD) pro cholesterol je 20 %.

a) Co vyjadřuje hodnota CD?

b) Jaký závěr lze udělat z obou vyšetření? Je nutno udělat třetí vyšetření nebo lze uzavřít, že průměrná hodnota z obou vyšetření je 5,6 mmol l^{-1}?

•

•

•

4 2. U pana P. (36 let) byla opakovaně zjištěna hladina cholesterolu kolem 8,1 mmol l^{-1}. Hladina LDL-cholesterolu byla 4 mmol l^{-1}. Hodnocení dietních návyků přineslo informaci, že jeho příjem cholesterolu je kolem 600 mg den^{-1}. Muži byla doporučena dieta s nízkým obsahem cholesterolu a změna životního stylu. Po třech měsících byla zjištěna průměrná hodnota cholesterolu 7,4 mmol l^{-1}. Muži byl předepsán preparát Colestid (obsahuje kolestipol-hydrochlorid), který váže v tenkém střevě žlučové kyseliny a zvyšuje jejich exkreci do stolice. Užívání tohoto léku vedlo ke snížení hodnot cholesterolu na rozmezí 5,7 - 6,4 mmol l^{-1}.

a) Jak lze hodnotit první nálezy cholesterolemie?

b) Které typy potravin by měly být vynechány a které by naopak měly převažovat ve stravě pana P.?

c) Je příjem cholesterolu potravou jediným zdrojem cholesterolu v organismu?

d) Jaký je vztah mezi cholesterolem a žlučovými kyselinami? Proč užívání Colestidu mohlo vést ke snížení hladiny (koncentrace) cholesterolu?

•

•

•

•

•

4 3. U pana Z. (40 let) byly prokázány vysoké hladiny celkového a LDL-cholesterolu (10 mmol l^{-1}, resp. 8,6 mmol l^{-1}). Při klinickém vyšetření byla zjištěna charakteristická xantomata na šlachách. Otec pana Z. zemřel v 55 letech na infarkt myokardu. Bylo uzavřeno, že pacient trpí familiární hypercholesterolemií. Příčinou této choroby je defekt v genu pro LDL receptor.

a) Čím lze vysvětlit zvýšenou hladinu cholesterolu u pacienta?
b) Jak by bylo jednoznačně možno potvrdit diagnózu?

•

•