

KAPPELMAYER JÁNOS DR., TÓTH JUDIT DR., V. OLÁH ANNA DR.

Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Laboratóriumi Medicina Intézet

MÓDSZERTANI VÁLTOZÁSOK A LIPIDPARAMÉTEREK MEGHATÁROZÁSÁBAN A XXI. SZÁZADBAN

A LABORATÓRIUMI MÓDSZEREK FEJLŐDÉSÉVEL AZ ELMÚLT ÉVTIZEDEKBEN HÁROM FŐ VÁLTOZÁS TÖRTÉNT A KARDIOVASZKULÁRIS PARAMÉTEREK MÉRÉSÉBEN: I. A MÓDSZEREK ÉS A REFERENCIAANYAGOK FEJLŐDÉSÉVEL EGYRE PONTOSABBAN TUDJUK MEGHATÁROZNI A PARAMÉTEREKET; II. A METODIKAI REPERTOÁR BŐVÍTÉSÉVEL EGYRE TÖBB LABORATÓRIUMI VIZSGÁLAT VÁLT A NAPI RUTINELLÁTÁS RÉSZÉVÉ, ÉS FOG VÁLNI MÉG INKÁBB AZ ELKÖVETKEZŐ ÉVEKBEN; III. A MŰSZERES ANALITIKA TERÉN BEKÖVETKEZŐ INNOVATÍV MEGOLDÁSOK RÉVÉN JELENTŐSEN NŐTT A LABORATÓRIUMOK MÉRÉSI KAPACITÁSA, AMELY MÁRA MÁR A TÖBB TÍZEZER TESZT/NAP ÉRTÉKET IS ELÉRTÉ A NAGYOBB LABORATÓRIUMOKBAN. EZEN LABORATÓRIUMI DIAGNOSZTIKAI FEJLŐDÉSNEK RÉSZESEI A KARDIOVASZKULÁRIS RIZIKÓ MEGÍTÉLÉSÉBEN HASZNÁLT PARAMÉTEREK, KÜLÖNÖS TEKINTETTEL A HOMOGEN HDL- ÉS LDL- TESZTEKRE, AMELYEK KIVÁLTOTTÁK A KORÁBBI ÉVTIZEDEK FÁRADÁSOS TECHNIKÁIT VAGY PONTATLAN BECSLÉSEIT. AZ ELKÖVETKEZŐ ÉVTIZEDBEN VÁRHATÓ, HOGY A JELENLEG MÉG CSAK KUTATÓLABORATÓRIUMI KÖRNYEZETBEN HASZNÁLT TÖBB SPECIÁLIS DIAGNOSZTIKAI TESZT BEVONUL A NAPI RUTINLABORATÓRIUMI PARAMÉTEREK KÖZÉ.

KULCSSZAVAK: KOLESZTERIN, HDL-C, LDL-C, HOMOGEN ESSZÉK

METHODOLOGICAL IMPROVEMENTS IN THE MEASUREMENT OF LIPID PARAMETERS IN THE XXIst CENTURY. WITH THE ADVANCEMENT OF LABORATORY METHODS, THE PAST YEARS HAVE WITNESSED THREE MAJOR TYPES OF CHANGES IN THE MEASUREMENT OF CARDIOVASCULAR PARAMETERS I. THE ASSAYS HAVE BECOME MORE PRECISE WITH THE IMPROVEMENT OF METHODS AND BY CREATING STABLE REFERENCE MATERIALS, II. BY WIDENING THE METHODOLOGICAL PORTFOLIO, MORE AND MORE TESTS BECAME INCORPORATED IN THE CARDIOVASCULAR PANEL AND THIS NUMBER IS FURTHER INCREASING, III. BY INNOVATIVE SOLUTIONS IN ANALYTICAL TECHNIQUES, THE TESTING CAPACITY OF THE DIAGNOSTIC LABORATORIES HAS INCREASED TREMENDOUSLY. CARDIOVASCULAR TESTS WERE INVOLVED IN THESE IMPROVEMENTS PRIMARILY BY THE INTRODUCTION OF HOMOGENOUS ASSAYS FOR THE MEASUREMENT OF HDL-C AND LDL-C. IN THE NEXT DECADE IT IS EXPECTED THAT SEVERAL TESTS THAT ARE RECENTLY ONLY CARRIED OUT IN RESEARCH LABORATORY SETTINGS, WILL BE INCORPORATED INTO THE DAILY DIAGNOSTIC CARDIOVASCULAR PANEL.

KEYWORDS: CHOLESTEROL, HDL-C, LDL-C, HOMOGENOUS ASSAYS

BEVEZETÉS

A lipidanyagcsere terén eddig a legnagyobb elismerés az 1985-ben kiadott orvosi Nobel-díj volt, amelyet két dallasi kutatóorvos, Michael Brown és Joseph Goldstein kaptak megosztva a koleszterinnek a metabolizmus szabályozásában elért alap-

vető felismeréseikért (1). Igazából a Nobel-díj mindig kissé megkésve érkezik, hiszen az alapvető felfedezések számos esetében a díj átvétele előtt több évtizeddel történtek. Brown és Goldstein esetében ez a latenciaidő nem volt igazán hosszú, ők a díjazott felfedezéseket megalapozó publikációkat kb. egy évtizeddel

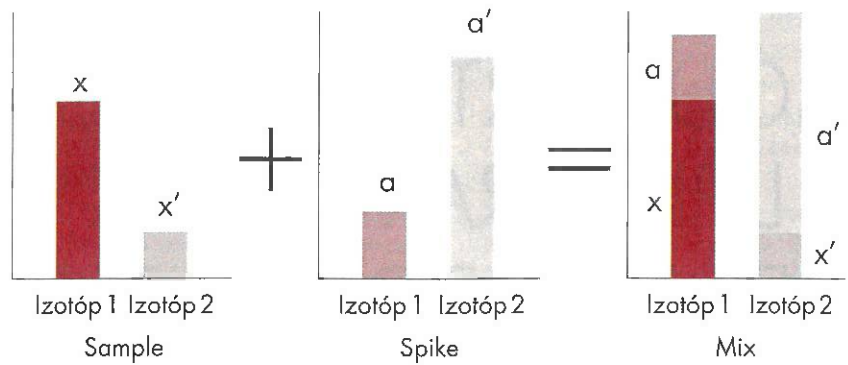
korábban közzétették (2), és a Nobel-díj átvételekor már 200-hoz közelítő publikációjuk volt ezen témakörben, szinte mindegyik cikkük vezető tudományos folyóiratban jelent meg. Jelentős részben az ő munkásságuk vezetett ahhoz, hogy először az Egyesült Államokban, majd szerte a fejlett világban központi kérdéssé vált

a kardiovaszkuláris megbetegedések megelőzésére a koleszterin rutinszerű mérése, amire a 60-as, 70-es években kidolgozták azt a laboratóriumi módszert, amely alapján ma is történik a meghatározás. Nagyon fontos volt az is, hogy a laboratóriumi automatizáció a múlt század 70-es éveiben igen gyorsan fejlődött, így nemcsak jól reprodukálhatóan és pontosan lehetett már koleszterint mérni, de a laboratóriumok óriási mintaszámot is fel tudtak dolgozni gyors leletátfordulási idővel. Mint a legtöbb laboratóriumi teszt esetén – pl. glükózmérésnél is – a diagnózis felállításához egyetlen mérés is elegendő, viszont a kezelés hosszú évtizedei alatt a rendszeres mérések jelentik igazából a vizsgálatok zömét, ez kifejezetten igaz a lipidparaméterek mérésére. Jórészt ezen technológiai fejlődés teremtette meg az alapját annak, hogy az 1980-as években az Egyesült Államokban a National Heart, Lung and Blood Institute elindíthatta a National Cholesterol Educational Programot (NCEP), hogy az általános érdeklődés középpontjába állítsa a hypercholesterinaemia kimutatását, és fejlessze a vonatkozó klinikai laboratóriumi tesztek.

A koleszterinszint-mérések nem kizárólag a fentiek miatt terjedtek el olyan óriási számban az elmúlt évtizedekben, a XXI. század elejére általánossá vált életforma, a folyamatos ülőmunka, a mozgásszegény életmód, az elhízás, a 2-es típusú cukorbetegség magas aránya, valamint jórészt a felgyorsult élettempó és a környezeti tényezők miatt is megjelenő magas esszenciális hipertónia aránya eleve determinált egy olyan populációt, amelynek nagy a rizikója kardiovaszkuláris megbetegedésekre. Ezeknek az embereknek valamelyest sikerült ugyan kordában tartani a hipertóniáját, de a diabéteszük nem múlt el, és a túlsúlyt, vagy az utóbbi évtizedekben a kóros – nemritkán extrém mértékű – elhízást sem sikerült eliminálni. Maradt tehát az egyetlen hatékony lehetőség a kardiovaszkuláris megbetegedési rizikó csökkentésére: a koleszterinszint csökkentése.

Természetesen az elmúlt évtizedek nem kizárólag az összkoleszterinszint mérésének finomodását hozták, hanem mára kialakult egy, számos

1. ÁBRA: AZ IZOTÓPHÍGÍTÁSOS TÖMEGSPEKTROMETRIÁS MÓDSZER (ID-MS) ELVE



Az izotóphígításos tömegspektrometriás módszernél a szérummintához (sample) ismert koncentrációban a mért analitra jellemző, kétféle tömegszámú fragmentet adnak (spike). A keverékben (mix) ezeket meghatározva kiszámítható a mintában lévő analit koncentrációja. Forrás: en.wikipedia.com

laboratóriumi paramétert magában foglaló, kardiovaszkuláris laboratóriumi panel. Ebben a közleményben arra teszünk kísérletet, hogy összefoglaljuk azon legfontosabb metodikai változásokat, amelyek a XXI. században történtek a kardiovaszkuláris szempontból fontos laboratóriumi paraméterek esetében. A korlátozott terjedelem miatt számos fontos vizsgálatot – mint a triglicerid-meghatározás, a lipoproteinek elektroforetikus vizsgálata, a nagy érzékenységgű CRP- vagy a homocisztein-meghatározás – nem tárgyalunk ebben a közleményben.

A LIPIDMEGHATÁROZÁSI MÓDSZEREK ÁTTEKINTÉSE

A lipidek laboratóriumi meghatározása jelentősen eltér az analitikai kémiai és a diagnosztikai laboratóriumokban. A lipidek kémiai szerkezetük alapján az alábbi öt csoportra oszthatók:

- ➔ koleszterin
- ➔ zsírsavak
- ➔ glicerín-észterek
- ➔ szfingolipidek
- ➔ terpének

A gyakorló lipidológusok számára nyilvánvaló, hogy ezen csoportoknak a diagnosztikai haszna jelentősen eltér, és leginkább két csoportra korlátozódik, a koleszterinre és a glicerín-észterekre, az utóbbiakat a napi laboratóriumi gyakorlatban trigliceridként definiáljuk.

A laboratóriumok számára kell egy zsinórmérték, amihez az eredményeket tudják viszonyítani. Ez azt jelenti,

hogy a legtöbb laboratóriumi paraméterre, így a lipidek meghatározására is, létezik egy referencia-módszer és egy referenciaanyag. A referencia-módszereket nem alkalmazzák rutinlaboratóriumi körülmények között, kivitelezésük általában igen körülményes, viszont alapul szolgálnak elsődleges kalibrátor anyagok kidolgozásához.

A KOLESZTERINMEGHATÁROZÁS REFERENCIA-MÓDSZERE: IZOTÓPHÍGÍTÁSOS TÖMEGSPEKTROMETRIA (ID-MS)

A tömegspektrometriás módszerek alapja az, hogy a szerves vagy szervetlen molekulákból képződő, általában töltéssel rendelkező fragmentek mágneses térben tömeg/töltés (m/z) szerint elválaszthatóak. A molekula szerkezetére jellemző fragmentek mennyisége arányos a mért analit koncentrációjával.

A tömegspektrométert kapcsolhatják gáz- vagy folyadékkromatográfhoz (GC-MS, vagy LC-MS), illetve egy másik tömegspektrométerhez (tandem MS). Az izotóphígításos tömegspektrometria a referens anyagok koncentrációjának mérésére az 1990-es években, az USA-ban kifejlesztett hatékony módszer. Ennek lényege, hogy a szérummintához olyan elegyet adnak, amely ismert koncentrációban tartalmazza a mért analitra jellemző, kétféle tömegszámú fragmentet (izotópok). Ha a keverékben tömegspektrométerrel meghatározzák ezeket, kiszámítható a mintában lévő analit koncentrációja.

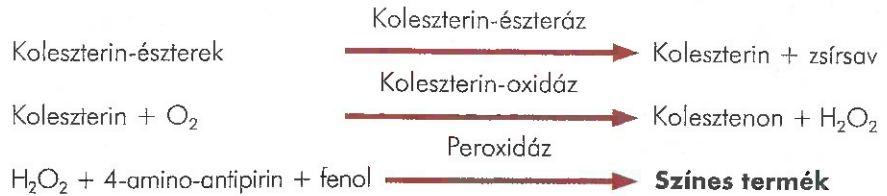
Az ID-MS lehetővé tette laboratóriumi módszerek összehasonlítását és az egységes kalibrációnak köszönhetően ezek standardizálását. Ennek kifejlesztését és fenntartását a klinikailag jelentős analitokra a Nemzeti Standardizációs Intézet (NIST) és az FDA is támogatta (3). Az utóbbi évtizedekben az ID-MS módszerre visszavezethető kalibrátorok általánosvá válása a klinikai kémiában és az immunkémiában lehetővé tette a koleszterinmeghatározás standardizálását is (1. ábra).

A koleszterinmeghatározás referencia-módszerét (GC-MS) 2011-ben írták le ID-MS-kalibrációval (4). Ennek és a homogén enzimikus módszereknek köszönhetően a koleszterin, HDL-C, LDL-C pontossága, reprodukálhatósága a külső QC szerint a legtöbb esetben megfelel a mai elvárásoknak (5).

Az érbetegségek szempontjából informatív a különböző apolipoproteinek meghatározása is. Az ApoA1 és az ApoB proteinek immunturbidimetriásan határozhatók meg, előbbi a HDL, utóbbi az LDL specifikus proteinje. Ezen vizsgálatok a XX. század utolsó évtizedeiben kerültek be a rutindiagnostics repertoárba, akkor még a széles körben alkalmazott Laurell-féle rakéta-elektroforézis technikával. A betűvel ellátott többi apolipoprotein nem tartozik az általános rutindiagnostics repertoár közé, ami érthető is, hiszen az apo C-I, C-II, C-III és E fehérjék mindegyik lipoproteinben előfordulnak eltérő arányban. Ezzel ellentétben az Lp(a) az elmúlt években az európai diagnostics laboratóriumok kb. 15-20%-ában általánosan mért paraméterre vált. Jelentősége van még az aterogén non-HDL (fCho-HDL) számításának is, amelyet a nyugat-európai laboratóriumokhoz hasonlóan a lipidleletek részének kell tekintenünk.

A fenti lipoprotein-komponenseket először a szérum ultracentrifugálásával választották el, amely hosszadalmas, manuális módszer. Az ultracentrifugált minta tetején van a kilomikron, majd a nagyon kis sűrűségű VLDL (very low density), a közepes sűrűségű IDL (intermediate density), a kis sűrűségű LDL (low density) válik el, a legnehezebb HDL (high density lipoprotein) van a cső alján (1. táblázat).

2. ÁBRA: A KOLESZTERINMEGHATÁROZÁS ELVE



1. TÁBLÁZAT: A FŐ LIPOPROTEINEK KÉMIAI JELLEGZETESSÉGEI

LIPOPROTEIN	LIPID %	PROTEIN %	KOLESZTERIN %	TRIGLICERID %	FOSZFOLIPID %
KILOMIKRON	98	2	8	84	7
VLDL	90	10	22	50	18
LDL	75	25	50	4	21
HDL	60	40	30	8	29

Kilomikronok (KM) – trigliceridben dúsak, a bélben keletkeznek a táplálék fogyasztása után, félétidejük rövid; VLDL – nagyon kis sűrűségű lipoprotein, trigliceridben gazdag, a májban keletkezik; LDL – kis sűrűségű lipoprotein, a perifériás szövetekben keletkezik, sok koleszterint tartalmaz; HDL – nagy sűrűségű lipoprotein, keringő koleszterint visz a májba (reverz koleszterintranszportban vesz részt).

LIPIDPARAMÉTEREK MEGHATÁROZÁSA ÉS KONCENTRÁCIÓJUK

Kétségtelenül a koleszterin volt az első paraméter, amelyet „rutinszerűen” meghatároztak a laboratóriumok, különösen mivel a magas koleszterinértékek és a kardiovaszkuláris megbetegedések kapcsolata már a XX. század első felében nyilvánvalóvá vált. Ezen évtizedekben azonban még a mai rutinszerű mérésről egyáltalán nem beszélhetünk, hiszen a koleszterin többszörös extrakciója és az ezt követő fáradságos kémiai reakció – különösen a korabeli készülékek teljesítőképességét figyelembe véve – azt eredményezte, hogy néhány minta mérése napokig tartott, és a laboratóriumok közti referenciatartományokban sem volt átjárhatóság, a legtöbb laboratórium maga határozta meg, hogy mi a normális, és mi a kóros.

Az igazi áttörést a XX. század második felében bevezetett enzimikus klinikai kémiai tesztek hozták meg, amelyek az oxidáz-peroxidáz enzimek segítségével pontosan és reprodukálhatóan először tudtak meghatározni szubsztátokat, pl. glükózt vagy koleszterint. Ezeket a módszereket automatizálták később, így egy mai nagylaboratóriumnak nem probléma napi akár több ezer koleszterinmérést elvégezni.

A koleszterinkoncentráció születéskor 1,7 mmol/l körüli, és nagyjából fele-fele arányban oszlik meg az LDL

és a HDL között, és a VLDL-arány nagyon alacsony. A születéskori triglicerid átlagosan 0,4 mmol/l, míg a fő apoproteinek koncentrációi az alábbiak: apoA1: 0,8 g/l, apoB100: 0,33 g/l, és az Lp(a): 40 mg/l, és már az első élethónapok során meredeken emelkednek a lipidkoncentrációk.

A mai koleszterinmérési módszerek először a koleszterin-észtereket bontják el koleszterin-észterázzal, majd a koleszterint oxidálják, és a hidrogén-peroxid hatására kialakult színes terméket fotometriásan mérik.

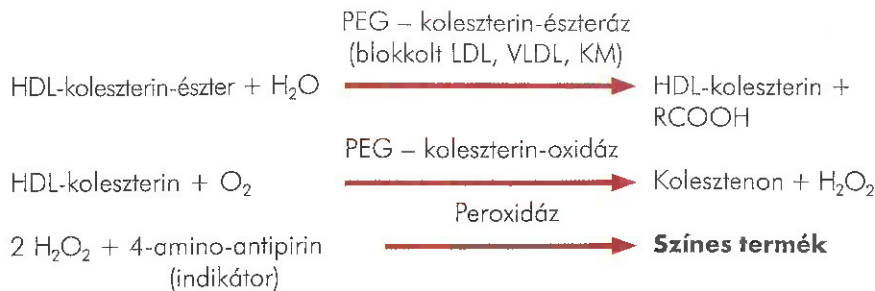
Az enzimikus módszereknél felléphetnek interferenciák. A mintában lévő növényi szterolok is reagálnak a koleszterin-oxidázzal, emelik a mért koleszterinszintet, bár ezek koncentrációja a humán mintákban igen alacsony. A redukáló aszkorbinsav és a hemolizált mintában lévő hemoglobin bontja a reakcióban képződő hidrogén-peroxidot, így ezek a peroxidázos módszernél alámérést okozhatnak, de mára a reagensek fejlődésével ezen interferenciákat jórészt kiiktatták. Az enzimikus módszer előnye, hogy egy módosított formája, amely nem tartalmazza a koleszterin-észterázt, alkalmas a szabad (noneszterifikált) koleszterin meghatározására. Noha egyéb enzimek is léteznek a koleszterin átalakítására – pl. koleszterin-dehidrogenáz –, a CHOD-POD módszer tulajdonképpen egyeduralkodó a világban, szinte minden laboratórium ezt használja (2. ábra).

HDL-KOLESZTERIN- (HDL-C-) MEGHATÁROZÁSI MÓDSZEREK

A HDL-C meghatározása kulcsfontosságú a kardiovaszkuláris rizikó megítélése szempontjából. Azt mondhatjuk, hogy megközelítőleg az összkoleszterin 1/3-ad része HDL-C, és 2/3-ad része LDL-C formájában van jelen, és az egyéb lipoproteinek – mint az Lp(a) és az IDL – minimális mértékben járulnak hozzá az összkoleszterin értékéhez, az előbbi 0,08 mmol/l, míg az utóbbi 0,05 mmol/l értékkel. A HDL-C-és LDL-C-meghatározásokról korábbi években a mi munkacsoportunk is közölt ezen folyóiratban (6, 7).

1. Kicsapósos módszer: Régebben a HDL-koleszterintől a többi lipidfrakciót különböző kicsapószerrel elkülönítették, és centrifugálás után a felülúszóból enzimatikusan meghatározták a HDL-C-t. Mivel ez a szeparálás nem automatizálható, a módszer kb. 20 éve kiszorult a diagnosztikai laboratóriumokból. Kutatási célra alkalmaznak kicsapó reagenset (heparin, mangán-klorid, dextrán-szulfát), és ultracentrifugálással a felülúszóból a HDL-C szubfrakciók is meghatározhatók enzimatikusan (8).
2. Direkt enzimátikus HDL-koleszterin-meghatározás: Áttörést jelentett ez a kicsapás nélküli, teljesen automatizálható módszer (9), amely a tömegspektrometriás standard eljárással jól korrelál, szemben a régi kicsapósos módszerrel, amely alá-mérte a HDL-C értékét. Utóbbinak az lehetett az oka, hogy kicsapással a HDL-C apolárosabb pre- β -ta frakcióját eltávolították, míg a mai direkt módszerek ezt is mérik. A legújabb homogén enzimátikus módszerek lényege, hogy Mg^{++} ionok jelenlétében a ciklodextrin inaktív komplexet képez a HDL-től különböző lipidekkel (LDL, IDL, VLDL, KM), és a polietilénlikollal módosított enzimek (PEGME) csak a HDL-frakciót bontják (3. ábra). Az új generációs tesztek kalibrátorra a referencia-módszerre vezethető vissza, és a NCEP (National Cholesterol Education Program) által validált (10).

3. ÁBRA: A HDL-C-MEGHATÁROZÁS ELVE



HDL-C MEGHATÁROZÁSA HOMOGÉN ENZIMATIKUS MÓDSZERREL

A mai módszerekkel a HDL-C a korábbinál magasabb érték, így felvetődött az igény a referenciatartomány emelésére. Az NCEP 2001 évi irányelve szerint az 1 mmol/l alatti HDL-C alacsony, azaz magas a kardiovaszkuláris kockázat, míg 1,56 mmol/l feletti HDL-C-értéknél kicsi a kardiovaszkuláris kockázat. A kardiovaszkuláris betegségek megelőzéséről és kezeléséről szóló II. Magyar Terápiás Konszenzus Konferencia férfiaknál az 1 mmol/l feletti HDL-C-t, nőknél viszont az 1,3 mmol/l feletti HDL-koleszterint tekinti célértéknek nagy kardiovaszkuláris kockázatú állapotban, amelyekkel korábbi közleményeinkben mi is foglalkoztunk (6, 7).

3. A közelmúltban a gél-elektroforézis és az enzimátikus festés kombinációját is leírták elsősorban kutatási célra. Bár ez egy időigényes, manuális módszer, a segítségével pl. a HDL-C-szubfrakciók elválaszthatók, majd a fentiekhez hasonló enzimátikus reagenssel koncentrációjuk meghatározható.

LDL-KOLESZTERIN- (LDL-C-) MEGHATÁROZÁSI MÓDSZEREK

A NAGY KLASSZIKUS: A FRIEDEWALD-KÉPLET

Az ezredfordulóig a legtöbb laboratórium Friedewald-formulával (11) számította az LDL-koleszterint: $LDL-C = \text{tCho} - HDL - TG/2,2$. Fontos, hogy ebben a képletben minden paraméter mmol/l-ben van kifejezve. Amennyiben a dimenzió mg/dl-es mértékegységet tartalmaz, a trigliceridet 5-tel kell elosztani. A Friedewald-

formulát leíró nagyon rövid közlemény nem véletlenül lett a klinikai kémia szakterületnek az egyik legidézettebb közleménye több mint húszeszes citációval, ugyanis ez volt az első lehetőség arra, hogy ultracentrifuga használata nélkül meg tudjuk adni az LDL-C szintjét, amely a kardiovaszkuláris rizikó megítélése szempontjából a legfontosabb paraméter.

A számított LDL-C hátránya azonban, hogy kb. 4-12%-os, de lipaemiás mintánál akár 30%-os alábecslést is okozhat. Emiatt a homogén enzimátikus LDL-tesztek megjelenése – tehát az ezredforduló – óta elsősorban a direkt meghatározást javasolják (12). A fenti tényezők miatt, valamint azért, mert a Friedewald-képlettel számított LDL nem alkalmazható a nem éhgyomri minták esetén (13), azt mondhatjuk, hogy 2020-ra az LDL-C számítása inkább költségcsökkentési okok miatt maradt fenn.

A mai direkt LDL-C-meghatározás elve, hogy az LDL-C-t detergenssel szelektíven oldják, a nem LDL típusú lipideket egy szénhidrát-komponenssel blokkolják, majd az LDL-C-t enzimátikusan határozzák meg. Az ilyen reagenssel még lipaemiás mintából is jól lehet az LDL-C értékét mérni (ha a TG < 13 mmol/l). Az LDL-C-meghatározás fő indikációja, hogy a koleszterincsökkentők rendelése az LDL-C-szinttől függ.

AZ LDL-C MEGHATÁROZÁSA SZELEKTÍV SZOLUBILIZÁCIÓVAL

Ennél a homogén enzimátikus módszernél szelektív detergenst alkalmaznak. Az ebben lévő szénhidrát/ Mg^{++} jobban kötődik a nem LDL-frakciókhoz (HDL < kilomikron < VLDL), így csak

az LDL-C lesz hozzáférhető a koleszterin-észteráz/koleszterin-oxidáz számára (4. ábra). A mérési tartomány széles, de a 13 mmol/l feletti TG zavar, ezáltal a lipaemiás minta gyakran nehézséget jelent.

AZ LDL-C MEGHATÁROZÁSA ELIMINÁCIÓS MÓDSZERREL

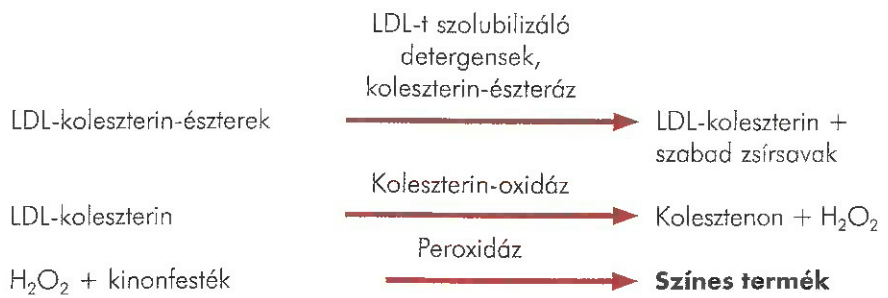
A módszer első lépésben védi az LDL-C-t, és egyidejűleg enzimekkel eliminálja a kilomikronokat, a VLDL-t és a HDL-t. A második lépésben csak a megmaradt LDL-C lesz mérhető kolorimetriás enzimátikus reakcióval. Fontos hangsúlyozni, hogy Brown és Goldstein már az 1980-as évek elején leírták, hogy az LDL-nek különböző módosulásokon kell átmennie ahhoz, hogy igazán aterogén legyen. Az utóbbi évek kutatásai arra is rávilágítottak, hogy ezen módosulások elsősorban a kisebb méretű és nagyobb sűrűségű (small-dense) LDL frakcióban jönnek létre leginkább (14). Számos modifikációt leírtak, amely fokozza az LDL makrofágok általi felvételét, mint a glikálódás, az aggregáció, az immunkomplekxképzés, a hidrolízis és az oxidáció. Kétségtelenül ez utóbbinak van a legnagyobb patológiai jelentősége, mivel a makrofágok azt gyorsan felveszik, és habsejteké alakulnak. Mindezen potenciális klinikai jelentőség ellenére még a legújabb laboratóriumi kézikönyvek sem tárgyalják a small-dense LDL rutinszerű meghatározását, és nem ajánlják az oxidált LDL szintjének rutinszerű mérését sem (4. ábra).

Azt mondhatjuk, hogy 2020 végén egész Európában az összkoleszterint meghatározó laboratóriumoknak kb. 60-70%-a méri valóban az LDL-koleszterint, a többi vagy a Friedewald-képlettel számítja, vagy nem végez LDL-C-méréseket. Bár számos más képletet leírtak az aterogén lipidek szintjének megadására (15), egyik sem vált olyan általánosan elfogadottá, mint a Friedewald-formula.

APOLIPOPROTEINEK MÉRÉSE

Az apolipoproteinek fehérjék, vagyis meghatározásuk ugyanolyan metodikával történik, mint a legtöbb, ala-

4. ÁBRA: AZ LDL-C-MEGHATÁROZÁS ELVE



csony koncentrációban jelen lévő specifikus fehérjének, vagyis specifikus immunreakcióval. Az apoproteinekből a laboratóriumi diagnosztikai kézikönyvek 10-félét ismernek, de ezek közül eddig csak három került be a napi rutindiagnosztikai repertoárba: az apoA1, az apoB100 és az Lp(a). Noha ezen apoproteinek mérése több évtizede bevonult a laboratóriumi gyakorlatba, a koleszterint és a trigliceridet mérő laboratóriumoknak kevesebb mint egyötöde méri ezen paramétereket.

Az apoA1 egy meglehetősen kis molekula, mindössze 29 kDa, és legfőbb funkciója, hogy a HDL-részecskének egyik strukturális összetevője. Ezenkívül az apoA1 a fő celluláris membrán szterol efflux fehérje, az ABCA1 ligandja, valamint a lecitin-koleszterin-acil-transzferáz (LCAT) enzim kofaktora.

Az apoB két formában létezik: az apoB100 és az apoB48, de éhomi állapotban a plazmában lévő apoB nagy része apoB100. Az apoB100 béta-lemezekből is áll az amfipatikus hélixeken kívül, aminek azért van jelentősége, mert ezeknek sokkal erősebb a lipidekhez való kötődése, ezáltal az apoB100 nem transzferálható egyik lipoproteintről a másikra. Az apoB egy jóval nagyobb molekula, 512 kDa-os molekulatömegénél a trunkált apoB48 kevesebb, mintegy feleakkora méretű, amint a protein neve is mutatja. Az apoB100 az a fehérje amelyet az LDL-receptor felismer.

LP(A)-MEGHATÁROZÁS

Az Lp(a) egy különleges lipoprotein, amely strukturálisan és a lipidek arányában hasonlít az LDL-hez, és egy apoB100-at tartalmaz. Ezenkívül az Lp(a) tartalmaz egy szénhidrátgazdag

lipoproteint is, az apo(a)-t, amely egy diszulfid híddal kovalensen kapcsolódik az apoB100-hoz. Közismert, hogy az apo(a) nagyfokú homológiát mutat a plazminogénnel. Ma az Lp(a) az egyik legproaterogénebb lipoproteinnak tartható, mivel nemcsak LDL-szerű hatásai vannak, hanem hat a fibrinolízisre, a szöveti faktor útvonal inhibitorára, valamint az oxidált fosfolipidek egyik fő szállítója is (16, 17, 18).

METODIKAI MEGFONTOLÁSOK APOLIPOPROTEINEK MÉRÉSE SORÁN

Az ApoB100 és apoA1 fehérjék relatíve magas koncentrációban vannak jelen a szérumban, mérésekre az immunturbidimetria vagy immunnefelometria megfelelő módszer. Mivel az apoB100 több lipoproteinen is jelen van, amelyek mérete és összetétele változó, ezért olyan assay-t kell használni, amely egyformán felismeri ezen különböző lipoproteineken elhelyezkedő apoB100-at. A helyzetet bonyolítja, hogy a különböző lipoproteineken a fehérje egy része maszkolt állapotban lehet, így a mérés előtt ezen fehérjeepitópokat elérhetővé kell tenni, amelyeket leginkább nem ionos detergenssek (pl. Tween-20) segítségével lehet elérni.

Ellentétben az apoB100- és apoA1-mérésekkel, az Lp(a)-meghatározás standardizációja még messze nem tökéletes. Ennek a következménye az, hogy több klinikai tanulmányban a közölt Lp(a)-koncentrációk nem mindig összevethetőek. Mindezek ellenére általában a referenciatartomány felső határaként általában a 300 mg/l-es érték az elfogadott, noha különböző etnikai csoportok között jelentős eltérések lehetnek.

PREANALITIKAI, ANALITIKAI ÉS POSZT- ANALITIKAI TÉNYEZŐK A LIPIDVIZSGÁLATOKBAN

Preanalitika: Egy 2020-as felmérés alapján a nyugat-európai laboratóriumok 2/3-ad része nem éhomi mintán mér lipidparamétereket, míg a 27%-a mindig éhomi mintát használ, és 7% pedig csak bizonyos esetekben (19). A lipidértékekben bekövetkező 10-20%-os eltérés – különösen egyéb rizikófaktorral is rendelkező betegpopulációban – gyakran lipidcsökkentő indikálással vagy dózisének változtatását eredményezheti. Ezért fontos azt tudni, hogy a vérvételi körülményekben bekövetkező banális változások jelentős eltéréseket okozhatnak a lipidértékekben. Hosszas vénás pangatás pl. 10-15%-os koleszterinszint-növekedést okozhat, míg ha egy 20-30 perces fekvő helyzet után történik a vérvétel, akkor 10%-kal csökkenhet a koleszterinszint. Ha minden vérvételi körülményt be is tartunk, kizárólag a biológiai variabilitás miatt 5-10%-ot változhat a koleszterin és a HDL-C értéke, míg a triglicerid értéke akár 20%-ot is.

Analitika: Az analitikai körülmények, úgymint a használt készülékek és diagnosztikai reagensek, meglehetősen univerzálisak, itt az analitikai folyamatokban csak az alábbi három területen lehet eltérés: az egyik az eredmény

dimenziója, amely vagy mmol/l vagy mg/dl, amely sokszor még egy országon belül is változhat (lásd Németország). A másik a korábbiakban részletezett két aspektus: az LDL-C mérése vagy számítása, illetve hogy a laboratórium megadja-e a non-HDL-koleszterin értékét. Ez többet egy 2020-as felmérés alapján a laboratóriumoknak alig több mint fele adja meg, 47% minden esetben, és 7% csak kérésre (19).

Posztanalitika: A lipideredményekkel kapcsolatos állásfoglalásban, az interpretáció esetén először is abban lehet eltérés, hogy mikor látunk el megkülönböztető jelzéssel (flag) egy eredményt, vagyis mit fogadunk el normálnak, és mit nem. Ezenkívül két olyan kérdés merülhet fel, amelyekben eltérések mutatkozhatnak, ezek az extrém trigliceridértékek megjelölése, illetve hogy mi az a koleszterinérték, ahol javasolt a familiáris hypercholesterinaemia kivizsgálását indikálni. Posztanalitikai tényezőnek tartható az eredmények interpretációja, amelyhez azt feltétlenül figyelembe kell venni, hogy súlyos akut megbetegedések (pl. stroke, myocardialis infarctus) után 3 hónap múlva várható a lipidértékek normalizációja.

ZÁRÓGONDOLATOK

A laboratóriumi diagnosztika – különösen a klinikai kémia – területén

eltöltött hosszú évek során leszűrhetjük azt a tapasztalatot, hogy azon laboratóriumi eljárások válnak általánosan elfogadottá, amelyek könnyen beilleszthetők a napi rutinba, vagyis a laboratórium üzemszerű működésébe. Minden olyan mintatípus vagy teszt, amely ezen üzemszerű működésbe nem vagy nehezen illeszthető, eleve vesztesre van ítélve. A kardiovaszkuláris paraméterek közül elég, ha megnézzük a jég között szállítandó homocisztein példáját, a kicsapásos HDL-technikát, vagy az egészen a legutóbbi ideig nem automatizálható, speciális lipidtesztek (pl. a small-dense LDL meghatározása). Amint az akadályok elhárulnak, pl. kihoznak egy homogén assay-t bizonyos paraméterekre, akkor általánossá válhat az alkalmazásuk, és akár jelentősen bővíthetik, vagy akár át is alakíthatják az elkövetkező évtized kardiovaszkuláris paneljét.

Köszönetnyilvánítás

A szerzők megköszönik a Debreceni Egyetem, Laboratóriumi Medicina Intézet Integrált Részlegének, kiemelten Kalina Editnek és Szakácsné Szilágyi Erikának az elmúlt évtizedek során végzett munkáját a lipidvizsgálatok kivitelezésében, valamint Kópis Ildikó titkárnőnek az adminisztratív segítségét a közlemény elkészültében.

IRODALOM

- Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, 1986; 232(4746): 34–47.
- Goldstein JL, Brown MS. The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Ann Rev Biochem* 1977; 46: 897–930.
- Bowers GN, Fossitt JD, White E. Isotope dilution mass spectrometry and the National Reference System. *Anal Chem* 1993; 65(12): 475–479R.
- Edwards SH, Kimberly MM, Pyatt SD, et al. Proposed serum cholesterol reference measurement procedure by gas chromatography-isotope dilution mass spectrometry. *Clin Chem* 2011; 57(4): 614–622.
- Mach F, Baigent C, Catapano AL, et al. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur Heart J* 2020; 41(1):111–188.
- Oláh AV, Ivády G, Kappelmayer J. Kényes paraméterek a kardiovaszkuláris betegségek diagnosztikájában. *Metabolizmus* 2008; Jan. Suppl.: 91–94.
- Oláh AV, Arató G, Kappelmayer J. Az LDL-koleszterin meghatározás aktuális kérdései. *Metabolizmus* 2010; Febr. Suppl.: 63–66.
- Hirano T, Nohtomi K, Koba S, et al. A simple and precise method for measuring HDL-cholesterol subfractions by a single precipitation followed by homogenous HDL-cholesterol assay. *J Lipid Res* 2008; 49(5): 1130–1136.
- Milda T, Nishimura K, Okamura T et al. Validation of homogenous assays for HDL-cholesterol using fresh samples from healthy and diseased subjects. *Atherosclerosis* 2014; 233(1): 253–259.
- Kimberly M, Leary E, Cole T et al. Selection, validation, standardization and performance of a designated comparison method for HDL-cholesterol for use in the Cholesterol Reference Method Laboratory Network. *Clin Chem* 1999; 45: 180–1812.
- Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18(6): 499–502.
- Aufenanger J, Zawta B. LDL Cholesterol: Don't guess. Measure it! *Clin Lab* 1999; 45: 617–622.
- Cohn JS, McNamara JR, Schaefer EJ. Lipoprotein cholesterol concentrations in the plasma of human subjects as measured in the fed and fasted states. *Clin Chem*. 1988; 34(12): 2456–2459.
- Ivanova EA, Myasoedova VA, Melnichenko AA et al. Small dense low-density lipoprotein as biomarker for atherosclerotic diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/1273042>
- Hattori J, Suzuki M, Tushima M, et al. Development of approximate formula for LDL-cho, LDL-apo B and LDL-cho/LDL-apo B as indices of hyperapobetalipoproteinemia and small dense LDL. *Atherosclerosis* 1998; 138: 289–299.
- Scaru AM. Lipoprotein(a), Friedewald Formula and NCEP Guidelines. *Am J Cardiol* 2001; 87: 608–609.
- Dalfino F, Sodré FL, Castilho LN, et al. Determinants of serum lipoprotein(a) concentration in normolipidemic individuals without clinical atherosclerosis. *Ann Clin Biochem* 2005; 42: 398–399.
- Koschinsky ML, Boffa MB. Lipoprotein(a): an important cardiovascular risk factor and clinical conundrum. *Endocr Metab Clinics North America*. 2014; 43(4): 949–962.
- DeWolf HA, Langlois MR, Suvisaari J et al. How well do laboratories adhere to recommended guidelines for dyslipidaemia management in Europe? The CARDiac MARKer Guideline Uptake in Europe (CAMARGUE) study. *Clin Chim Acta* 2020; 508: 267–272.