

Stanovení cholesterolu

Teorie: cholesterol je sloučenina lipidové povahy, patří mezi steroidy. Přítomen je ve všech živočišných tkáních, v krvi, ve žluči. **Je důležitou součástí buněčných membrán.** Zdrojem je potrava živočišného původu, ale existuje i endogenní syntéza cholesterolu.

V krevní plazmě se vyskytuje volný (cca 30 – 40%) nebo v podobě esterů s mastnými kyselinami. Aby mohl být transportován k cílovým místům v organismu, je nutná jeho vazba na bílkoviny, které plní funkci nosičů, potom hovoříme o lipoproteinech.

Lipoproteiny jsou částice s komplikovanou stavbou, v centru se nacházejí triacylglyceroly a estery cholesterolu a toto jádro je nepolární, tedy nerozpustné ve vodě. Obal částice je potom tvořen fosfolipidy, neesterifikovaným cholesterolem a apoproteiny. Lipoproteiny vznikají ve střevě a v játrech.

Lipoproteiny krevní plasmy tvoří velice heterogenní skupinu, lze je třídit podle několika kritérií. Nejčastěji se používá dělení lipoproteidů v analytické centrifuze podle tzv. hydratované hustoty.

Rozlišují se tyto frakce:

VLDL (lipoproteiny o velmi nízké hustotě) 0,95 – 1,006 g/ml

LDL (lipoproteiny o nízké hustotě) 1,019 – 1,063 g/ml

HDL (lipoproteiny o vysoké hustotě) 1,063 – 1,210 g/ml

Tzv. „dobrý a špatný cholesterol“:

LDL cholesterol: lipoproteinové částice tohoto typu transportují cholesterol do tkání, obsahují převážně aterogenní (aterosklerózu podporující) typ cholesterolu.

HDL cholesterol: tyto lipoproteinové částice obsahují méně cholesterolu a více bílkovin, transportují přebytečný cholesterol z tkání zpět do jater, odkud je vylučován do žluče. Toto je tedy příznivě působící cholesterol.

Norma pro celkový cholesterol: 3,87 – 5,2 mmol/l

Norma pro HDL: 1,25 – 2,59 mmol/l

Pro posouzení rizika aterosklerózy je nutné komplexní vyšetření celého lipidového profilu krevní plasmy, včetně posouzení rodinné zátěže, životosprávy, stravovacích návyků apod.

Jako hrubý orientační znak může sloužit tzv.

aterogenní index: Celkový cholesterol / HDL

U trénovaných osob: 3,5

Standardní riziko 5,0

Výrazně vyšší riziko vzniku aterosklerózy: 20

Postup stanovení celkového cholesterolu a HDL cholesterolu:

Stanovení se provádí se pomocí komerčně dodávaného setu výrobce Pliva Lachema.

Chemický princip stanovení: enzymatické stanovení cholesterolu pomocí cholesteroxidázy a oxidační kopulaci 4-aminoantipyrinu a fenolu peroxidem vodíku, katalyzované peroxidasou. Vlastní stanovení se provádí spektrofotometricky.

Pracovní roztok obsahující reakční složky je již připraven

Plasmu pro stanovení získáme odběrem kapilární krve z prstu do 4 ks hematokritových kapilár, které jsou už od výrobce zevnitř potaženy heparinem. Konce kapilárek zatavíme a kapilárky centrifugujeme jako při stanovení hematokritu. Poté velmi jemnou kapilárkou stáhneme plasmu ze všech kapilár od jednoho dárce do Eppendorfovy zkumavky. Z tohoto množství plasmy budeme používat:

25 μ l pro stanovení HDL cholesterolu

2 x 10 μ l pro stanovení celkového cholesterolu, stanoví se dva paralelní vzorky, pokud není plasmy dostatek, potom pouze jeden vzorek.

Stanovení celkového cholesterolu: do označených zkumavek pipetujeme:

Blank: 10 μ l dest. vody + 1 ml pracovního roztoku

Vzorek 2 paralelky: 10 μ l plasmy + 1 ml pracovního roztoku

Standard: 10 μ l standardu (od výrobce) + 1 ml pracovního roztoku

Obsah zkumavek protřepeme a inkubujeme při 37°C, inkubační směs nutno chránit před přímým světlem. Do 10 minut po skončení inkubace změříme absorbanci vzorku a standardu oproti blanku při 480 nm.

Výpočet: celkový cholesterol (mmol/l) = 5,17 . A vzorku / A standardu

Stanovení HDL cholesterolu:

Nejprve je nutno vysrážet v plazmě chylomikrony, VLDL a LDL lipoproteiny.

Postup při srážení:

Do Eppendorf, zkumavek napipetujeme 25 μ l plasmy a 50 μ l srážecího roztoku. Promícháme a po 10 minutové inkubaci při pokojové teplotě centrifugujeme 2 minuty při 3 000 ot. Pro stanovení HDL použijeme supernatant.

Do označených zkumavek pipetujeme:

Blank: 50 μ l dest. vody + 1 ml pracovního roztoku

Vzorek: 50 μ l supernatantu + 1 ml pracovního roztoku

Standard: 5 μ l standardu + 45 μ l dest. vody + 1 ml pracovního roztok

(standard je stejný jako v případě celkového cholesterolu)

Obsah zkumavek protřepeme a inkubujeme při 37°C, inkubační směs nutno chránit před přímým světlem. Do 10 minut po skončení inkubace změříme absorbanci vzorku a standardu oproti blanku při 480 nm.

Výpočet: HDL cholesterol (mmol/l) = 1,537 . A vzorku / A standardu

