

## Lipidový profil krevní plasmy, 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 lipoproteinů v analytické centrifuzě 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  $\mu$ l pro stanovení HDL cholesterolu

2 x 10  $\mu$ 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  $\mu$ l dest. vody + 1 ml pracovního roztoku

**Vzorek 2 paralelky:** 10  $\mu$ l plasmy + 1 ml pracovního roztoku

**Standard:** 10  $\mu$ 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  $\mu$ l plasmy a 50  $\mu$ 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  $\mu$ l dest. vody + 1 ml pracovního roztoku

**Vzorek:** 50  $\mu$ l supernatantu + 1 ml pracovního roztoku

**Standard:** 5  $\mu$ l standardu + 45  $\mu$ 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**

