

Univerzita Komenského Bratislava, Lekárska fakulta
Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie

LABORATÓRNY PROTOKOL BMF-LS - 10. seminár
Stanovenie triacylglycerolov (TAG) a cholesterolu v krvnom sére

Meno, krúžok:	Dátum:
---------------	--------

Princíp:

Stanovenie TAG:

Enzymovou hydrolýzou uvoľnený glycerol z TAG reaguje s ATP za vzniku glycerol-3-fosfátu. Glycerol-3-fosfát sa oxiduje účinkom enzýmu glycerolfosfát oxidázy, pričom sa uvoľňuje peroxid vodíka. Uvoľnený peroxid vodíka reaguje s 4-aminofenazónom v reakcii katalyzovanej peroxidázou za vzniku červeno sfarbeného produktu (4-(p-benzochinón-monoimino)-fenazón, ktorý stanovujeme fotometricky pri 510 nm.

Stanovenie celkového cholesterolu: Hydrolýzou pomocou cholesterolesterázy uvoľníme cholesterol z jeho esterov. Pomocou cholesteroxidázy sa voľný cholesterol oxiduje za vzniku H₂O₂, ktorý reaguje s 4-aminofenazónom a fenolom za vzniku červenofarbeného produktu.

Stanovenie HDL cholesterolu: Pri stanovení využívame možnosť vyvrážať LDL a VLDL zmesou kyselina wolfrámová / MgCl₂. Vyzrážané lipoproteíny odstránime centrifugáciou a v čírom supernatante nám ostávajú len vysokodenzné lipoproteíny HDL. Tie potom stanovíme rovnakou metódou jako celkový cholesterol.

vzorka	TAG 1	TAG 2	slepá vzorka
sérum 1	0,1 ml	---	---
sérum 2	---	0,1 ml	---
voda	---	---	0,1 ml
reakčná zmes	2,0 ml	2,0 ml	2,0 ml

Necháme stáť 10 minút a absorbanciu meriame voči slepej vzorke pri 510 nm.

vzorka	Celk. Chol ₁	Celk. Chol ₂	štandard	slepá vzorka
sérum 1	0,01 ml	---	---	---
sérum 2	---	0,01 ml	---	---
štandard	---	---	0,01 ml	---
voda	---	---	---	0,01 ml
reagens	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml

Necháme postáť 20 minút a absorbanciu meriame pri 510 nm.

vzorka	HDL ₁	HDL ₂	slepá vzorka
sérum HDL 1	0,1 ml	---	---
sérum HDL 2	---	0,1 ml	---
voda	---	---	0,1 ml
reagens	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml

Necháme stáť 20 minút a absorbanciu meriame voči slepej vzorke pri 510 nm.

Výpočty:

TAG:

	Pacient 1	Pacient 2
vzorka	TAG 1	TAG 2
absorbancia		
TAG (mmol/l - odpočítať z kalibračnej krivky)		

Celkový cholesterol:

vzorka	Celk. Chol ₁	Celk. Chol ₂	štandard
absorbancia			
celkový cholesterol (mmol/l)			5,0

HDL cholesterol:

(Pri výpočte koncentrácie HDL cholesterolu používame absorbanciu štandardu zo stanovenia celkového cholesterolu. Keďže sme však pritom použili len 0,01 ml štandardu a pri stanovení HDL sme použili 0,1 ml séra, musíme tento rozdiel zohľadniť tým, že **vypočítanú koncentráciu HDL vydáme 10**. Navyše je sérum pre stanovenie HDL **3x riedené**.)

vzorka	HDL ₁	HDL ₂
absorbancia		
HDL cholesterol (mmol/l)		
zohľadnenie riedenia a štandardu (x 3/10)		

LDL cholesterol:

LDL cholesterol počítame pomocou Friedewaldovej rovnice nasledovne:

$$\mathbf{LDL = celkový cholesterol - [(TAG / 2,2) + HDL]}$$

(TAG nesmie byť vyššie ako 4,6 mmol/l, inak je výpočet LDL nepresný.)

Aterogénny index (AI):

$$\mathbf{AI = (celkový cholesterol - HDL) / HDL}$$

(Hodnoty <4,85 znamenajú nízke riziko, hodnoty >4.85 znamenajú zvýšené riziko.)

Výsledky:

	Pacient 1	Pacient 2
TAG		
celkový cholesterol		
LDL		
HDL		
aterogénny index		

Referenčné hodnoty:

	pohlavie	fyziologické hodnoty
TAG	M	0,57 – 2,2 mmol/l
	F	0,57 – 1,9 mmol/l
celkový cholesterol	M + F	3,3 – 5,2 mmol/l
LDL	M + F	< 3,4 mmol/l
HDL	M	0,8 – 1,7 mmol/l
	F	0,9 – 2,0 mmol/l

Referenčné hodnoty pre vyhodnotenie rizika rozvoja aterosklerózy a jej komplikácií:

HDL	riziko		
	znížené	štandardné	vysoké
muži	> 1,4 mmol/l	0,9 – 1,4 mmol/l	< 0,9 mmol/l
ženy	> 1,6 mmol/l	1,15 – 1,6 mmol/l	< 1,15 mmol/l

Záver: