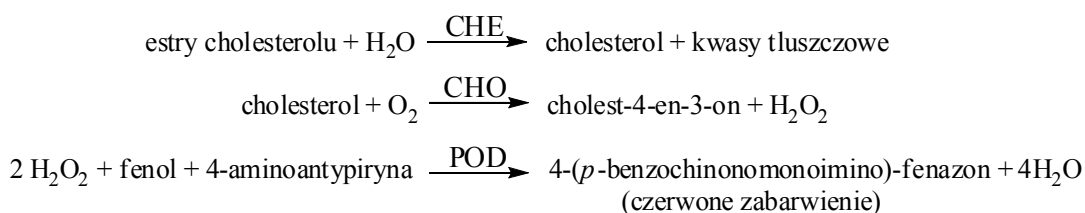


Oznaczanie cholesterolu całkowitego w surowicy krwi

Wprowadzenie

Cholesterol obecny w membranach komórkowych jest transportowany przez krew. Część cholesterolu jest syntezowana w organizmie człowieka (cholesterol endogenny), głównie w wątrobie. Cholesterol jest dostarczany także bezpośrednio z pożywienia (egzogenny). Organizmy zużywają cholesterol do budowy membran komórkowych i produkcji hormonów sterydowych. Cholesterol odgrywa też ważną rolę w komunikacji międzykomórkowej. Ulega on procesom metabolizmu w wątrobie i jest wydalany z żółcią, po przemianie do kwasów żółciowych. Podwyższony poziom cholesterolu (hipercholesterolemia) jest związany z chorobami układu krążenia (np. arterioskleroza), zbyt niski poziom (hipocholesterolemia) może być przyczyną depresji lub raka.

Z uwagi na ograniczoną rozpuszczalność w roztworach wodnych, cholesterol wiąże się z białkami i kwasami tłuszczowymi, tworząc lipoproteiny i estry. Oznaczanie cholesterolu we krwi wymaga zatem wstępnego uwolnienia cholesterolu z tych połączeń. Jest to realizowane przy udziale esterazy cholesterolowej (CHE), która hydrolizuje estry cholesterolu do wolnego cholesterolu. Cholesterol jest następnie przekształcany enzymatycznie do cholesten-3-onu przy udziale oksydazy cholesterolowej (CHO) z równoczesnym wydzieleniem nadtlenu wodoru. W metodzie Trindera (peroksydaza / fenol / 4-aminoantypiryna) powstaje 4-(*p*-benzochinonomoimino)-fenazon (chinonoimina) o czerwonym zabarwieniu. Intensywność zabarwienia jest wprost proporcjonalna do zawartości cholesterolu w próbce.



Cel ćwiczenia:

Celem ćwiczenia jest wykonanie praktycznego oznaczenia cholesterolu całkowitego metodą spektrofotometryczną z udziałem enzymów oraz poznanie zagrożeń wynikających z zachwiania równowagi cholesterolowej w organizmie.

Sprzęt i materiały:

- Roztwór wzorcowy cholesterolu o stężeniu 200 mg/dl,
- Surowica krwi ludzkiej,
- Zestaw diagnostyczny do oznaczania stężenia cholesterolu całkowitego
Lquick Cor-CHOL-skład:
 - bufor Good'a (pH 6.4) 100 mmol/l
 - fenol 5 mmol/l
 - 4-aminoantypiryna 0,3 mmol/l
 - esteraza cholesterolu (CHE) >3,2 μ kat/l
 - oksydaza cholesterolu (CHO) >1,67 μ kat/l
 - peroksydaza (POD) >50 μ kat/l
- 6 Probówek typu eppendorf,
- Pipety automatyczne, końcówki do pipet,
- 1 Kuweta polistyrenowa (poj. 800 μ l) do pomiarów spektrofotometrycznych (d = 10 mm),
- Wyrząsarka typu Vortex,
- Spektrofotometr SPECORD M-40.

Wykonanie ćwiczenia:

1. Próba zerowa: odczynnik do oznaczeń pozostawić do osiągnięcia temperatury pokojowej. Do kuwety pobrać 800 μ l. Wykonać pomiary absorbancji przy długości fali 500 nm.
2. Próba wzorcowa: do probówki typu eppendorf dodać 1 ml odczynnika do oznaczeń. Pozostawić do osiągnięcia temperatury pokojowej. Następnie dodać 10 μ l roztworu wzorcowego. Wymieszać i pozostawić na 10 min. Przenieść 800 μ l roztworu do kuwetki. Wykonać pomiar absorbancji przy długości fali 500 nm

względem próby zerowej jako próby odniesienia. Pomiar wykonać dla czterech niezależnych prób.

- Próbka badana: do próbówki typu eppendorf dodać 1 ml odczynnika do oznaczeń. Pozostawić do osiągnięcia temperatury pokojowej. Następnie dodać 10 μ l roztworu badanego. Wymieszać i pozostawić na 10 min. Przenieść 800 μ l roztworu do kuwetki. Wykonać pomiar absorbancji przy długości fali 500 nm względem próby zerowej jako próby odniesienia. Pomiar wykonać dla czterech niezależnych prób.

Próba Składnik próbki	Zerowa (PZ)	Wzorcowa (PW)	Badana (PB)
Odczynnik do oznaczeń	800 μ l	1 ml	1 ml
Pozostawić do osiągnięcia temperatury pokojowej			
Roztwór wzorcowy	---	10 μ l	---
Roztwór badany	---	---	10 μ l
Wymieszać i pozostawić na 10 min. w temperaturze pokojowej. Przenieść 800 μ l roztworu do kuwetki. Czterokrotnie wykonać pomiar absorbancji przy długości fali 500 nm względem próby zerowej jako próby odniesienia. Pomiar wykonać dla czterech niezależnych prób.			

Opracowanie wyników:

- Obliczyć stężenie cholesterolu w badanej próbce korzystając ze wzoru:

$$\text{Stężenie cholesterolu} = A(\text{PB}) / A(\text{PW}) \times \text{stężenie wzorca}$$

WARTOŚCI PRAWIDŁOWE (surowica/osocze)

Dzieci	≤4 tygodnie	50-170 mg/dl (1.3-4.4 mmol/l)
	2-12 miesięcy	60-190 mg/dl (1.6-4.9 mmol/l)
	≥1 rok	110-230 mg/dl (2.8-6.0 mmol/l)
Dorośli		<200 mg/dl (<5.2 mmol/l)

Zalecane jest opracowanie przez każde laboratorium własnych zakresów wartości prawidłowych charakterystycznych dla lokalnej populacji.

- Przeprowadzić analizę statystyczną wyników, obliczając średnią zawartość cholesterolu w próbce, odchylenie standardowe oraz procentowy błąd oznaczenia.

Literatura uzupełniająca:

1. W. Szczepaniak, *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*, PWN Warszawa 1996.
2. A. Manz, N. Pamme, D. Iossifidis, *Bioanalytical Chemistry*, ICP, London 2004.
3. A. Dembińska Kieć, J.W. Naskalski, *Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej*, Elsevier Urban & Partner, 2002.
4. L. Kłyszejko-Stefanowicz, *Ćwiczenia z biochemii*, PWN Warszawa 1999.
5. L. Stryer, *Biochemia*, PWN Warszawa 1999.

Zagadnienia:

1. Cholesterol (budowa, poznanie zagrożeń wynikających z zachwiania równowagi cholesterolowej w organizmie, metody oznaczania cholesterolu we krwi).
2. Spektrofotometria UV-Vis (prawa absorpcji i odchylenia od tych praw, aparatura).
3. Opracowanie wyników i ich ocena statystyczna.