

SZÉRUM KOLESZTERIN ÉS TRIGLICERID MEGHATÁROZÁS

A koleszterin, a koleszterin észterek, triacilglicerolok vízben oldhatatlan vegyületek. E lipidek a májból történő szintézist, és/vagy táplálék abszorpciót követően a tároló, felhasználó szövetek irányába kerülnek elszállításra. Metabolizmusuk során keletkező termékeik továbbítása más szövetek felé fontos része a lipid transzportnak. A lipid transzport során apolipoproteinekkal - speciális carrier fehérjékkel - plazma lipoproteineket képeznek. A lipoproteinek keletkezése, felhasználása során fellépő zavarok különféle hipo-, illetve hiperlipoproteinémiákat okozhatnak. Ha a szintetizált és a táplálékkal felvett koleszterin mennyisége meghaladja a biomembránok képzéséhez, epesavak, szteroid hormonok szintéziséhez szükséges mennyiséget, a véredényekben a koleszterin patológiás akkumulációja - ateroszklerotikus plakk - alakul ki. A megfigyelések szerint a vér összkoleszterin szintje és a későbbiekben kialakuló coronaria elégtelenségen alapuló megbetegedések valószínűsége között egyenes arányú összefüggés van. Az összkoleszterin szint kb. 75 %-át képező LDL-koleszterin szint és az ischemiaszívmebetegedések gyakorisága között is egyenes arányú a kapcsolat. Az összkoleszterin szint mintegy 25 %-át képező HDL-koleszterin koncentráció fordítottan arányos a későbbiekben kialakuló ischémiás megbetegedések előfordulási valószínűségével.

Kórosan magas vértriglicerid szint mérhető koszorúér-betegségben szenvedők egy részénél. Az európai szakirodalom, ajánlások kockázati tényezőként említik az emelkedett vértriglicerid szintet, ugyanakkor az Amerikai Egyesült Államokban végzett vizsgálatokból levont következtetések elvetik a vértriglicerid szint kockázati tényezőként való figyelembevételét.

A szívmebetegedések kialakulásának esélye			
	kicsi	emelkedett	nagy
Összkoleszterin	<220	220-260	>260
Triglicerid	<150	150-200	>200
LDL-koleszterin	<150	150-190	>190
HDL-koleszterin	f > 55	35- 55	< 35
HDL-koleszterin	n > 65	45- 65	< 45

dimenzió: [mg/dl], n=nők, f=férfiak

A gyakorlat menete

A gyakorlat során normál és beteg szérum összkoleszterin, HDL-koleszterin, illetve triglicerid tartalmát határozzuk meg. A veszélyeztetett csoportok mind szélesebb körben megvalósuló rutin szűrővizsgálatát az a megfigyelés tette lehetővé, miszerint polianionok, illetve szulfatált polianionok és kétértékű kationok jelenlétében a VLDL és LDL frakciók csapadékot képeznek, centrifugálás után a felülúszóban maradó HDL-koleszterin tartalom meghatározható.

A HDL FRAKCIÓ ELVÁLASZTÁSA

A gyakorlaton a foszfowolfrámsav-MgCl₂ jelenlétében végzett kicsapási módszert alkalmazzuk. A VLDL-LDL frakciók csapadékát centrifugálással eltávolítjuk, és a felülúszóban a HDL-koleszterin meghatározásánál leírtaknak megfelelően mérjük meg a HDL-koleszterin mennyiségét.

Reagensek:

- 1.) 2 M MgCl₂ oldat
- 2.) Kicsapó reagens: 32 g/l foszfowolfrámsav és 0,4 mmol/l MgCl₂ 4:1 arányú elegye
- 3.) Normál, illetve beteg plazma, vagy szérum

Az elválasztás kivitelezése:

500 µl normál, illetve beteg plazma
50 µl kicsapó reagens

A mintákat Vortex típusú keverőkkel alaposan kevertetjük, majd 15 percig 5000 fordulat/perc centrifugáljuk. A felülúszót pipettával óvatosan eltávolítjuk és ebből koleszterin meghatározást végzünk. (A felülúszónak a centrifugálást követően áttetszőnek kell lennie).

SZÉRUMKOLESZTERIN MEGHATÁROZÁSA

1. A meghatározás elve

A meghatározás első lépéseként a koleszterinészterek hidrolízisét hajtjuk végre enzimatis úton (koleszterin észteráz). Bakteriális koleszterin oxidáz hatására koleszt-4-en-3-on és H₂O₂ keletkezik. Peroxidáz enzim hatására a hidrogén-peroxid fenollal és amino-4-antipirinnel vörös színű komplexet képez, mely 500-550 nm-en fotometrálnak.



2. Szérum összkoleszterin meghatározás

Reagensek:

- Reagens:** 50 mmol/l PIPES puffer pH 6,9; 24 mmol/l fenol
- Reagens:** 250 U/l koleszterin észteráz, 250 U/l koleszterin oxidáz, 1000 U/l peroxidáz, 0,5 mmol/l amino-4-antipirin, 2,5 mmol/l NaCl
- Reagens:** 5,17 mmol/l (200 mg/dl) összkoleszterin standard

Vizsgálati minta: szérum, vagy heparinos plazma

A vizsgálat kivitelezése:

Oldatok	1	2	3	4
Reagens keverék	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Összkol. standard	-	20 µl	-	-
Minta normál	-	-	20 µl	-
Minta beteg	-	-	-	20 µl
Deszt. víz	20 µl	-	-	-

A csövek tartalmát keverjük össze, majd 5 percig 37°C-os vízfürdőben inkubáljuk. Az extinkció értéket (A) 1 cm-es küvettában 500 nm-en a reagens kontrollal (1. cső) szemben olvassuk le.

Számítás: $A_{\text{minta}} / A_{\text{standard}} * n$

mmol/l: $n = 5,17$

mg/dl: $n = 200$

3. A HDL-koleszterin meghatározása:

Reagensek:

- Reagens:** 50 mmol/l PIPES puffer pH 6,9, 24 mmol/l fenol
- Reagens:** 250 U/l koleszterin észteráz, 250 U/l koleszterin oxidáz 1000 U/l peroxidáz, 0,5 mmol/l amino-4-antipirin, 2,5 mmol/l NaCl
- Reagens:** 1,3 mmol/l (50 mg/dl) HDL-koleszterin standard

Vizsgálati minta: a kicsapó reagenssel kezelt szérum, vagy heparinos plazma

A vizsgálat kivitelezése:

Oldatok	1	2	3	4
Reagens keverék	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
HDL-kol. standard	-	50 µl	-	-
Minta normál	-	-	50 µl	-
Minta beteg	-	-	-	50 µl
Deszt. víz	50 µl	-	-	-

A csövek tartalmát keverjük össze, majd 5 percig 37°C-os vízfürdőben inkubáljuk. Az extinkció értéket (A) 1 cm-es küvettában 500 nm-en a reagens kontrollal szemben olvassuk le.

Számítás: $A_{\text{minta}} / A_{\text{standard}} * n$

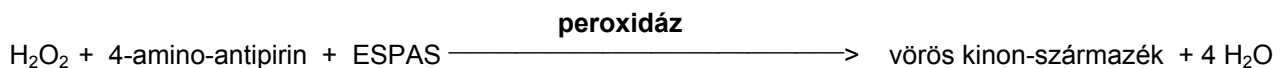
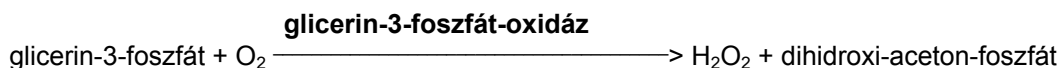
mmol/l: $n = 1,3$

mg/dl: $n = 50$

Szorozzuk meg a kiszámított értéket 1,1-el a kicsapó reagens hígító hatása miatt.

A SZÉRUM TRIGLICERID MEGHATÁROZÁSA

1. A meghatározás elve:



ESPAS: N-etil-N-szulfopropil-m-anizidin

Reagensek:

1. **Reagens:** 50 mmol/l PIPES puffer pH 7,5, 1 mmol/l N-etil-N-szulfopropil-m-anizidin
2. **Reagens:** 1100 U/l lipoprotein lipáz, 800 U/l glicerinkináz, 3000 U/l glicerín-3-foszfát oxidáz, 350 U/l peroxidáz, 0,7 mmol/l 4-aminó-antipirin, 0,3 mmol/l ATP
3. **Reagens:** 2,28 mmol/l glicerín standard (triolein ekvivalens), 200,0 mg/dl

Vizsgálati minta: szérum, vagy heparinos plazma

2.A vizsgálat kivitelezése:

Oldatok	1	2	3	4
Reagens keverék	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Standard	-	20 µl	-	-
Minta normál	-	-	20 µl	-
Minta beteg	-	-	-	20 µl
Deszt. víz	20 µl	-	-	-

A csövek tartalmát keverjük össze, majd 5 percig 37°C-os vízfürdőben inkubáljuk. Az extinkció értéket (A) 1 cm-es küvettában 545 nm-en a reagens kontrollal szemben olvassuk le.

Számítás: $A_{\text{minta}} / A_{\text{standard}} * n$

mmol/l: $n = 2,28$

mg/dl: $n = 200$

g/l: $n = 2$

Linearitás: 11,4 mmol/l értékig a fényelnyelés egyenesen arányos a koncentrációval.

Az LDL-koleszterin koncentráció kiszámítása

Az össz- és HDL-koleszterin, valamint a triglicerid meghatározás adatainak felhasználásával a szintén fontos LDL-koleszterin is meghatározható a következő összefüggés segítségével:

$LDL\text{-koleszterin} = \text{összkoleszterin} - (\text{HDL-koleszterin} + \text{triglicerid}/5)$

A fenti képlet 400 mg/dl-rel egyenlő vagy magasabb triglicerid érték, illetve I. és III. típusú hiperlipoproteinémia esetén nem alkalmazható. Szérum koleszterin, triglicerid és lipoprotein koncentráció méréséhez vérvételre a páciens reggel, éhgyomorral kell berendelni, mivel ezek szintje az étkezés idejétől függően állandóan változik. Számos tényező nehézkessé teszi a szérum koleszterin és triglicerid normál szint definiálását. A szérum koleszterin és triglicerid szint nő az életkorral is.

Az arterioszklerózis, plakkok stb. kialakulása szorosan kötődik e témakörhöz, terjedelme azonban túlmutat a gyakorlati jegyzet keretein.

Kérdések

1. Magyarázza meg a 'beteg' szérumban mért triglicerid, össz-, HDL-, illetve LDL - koleszterin értékeinek lehetséges okait?
2. Ismertesse, hogyan csökkenthető a plazma lipidszintje hiperlipidémiában?