

# Instrukcja do ćwiczenia 5

## WŁASNOŚCI I SKŁAD LIPIDÓW OSOCZA

### ZAGADNIENIA DO PRZYGOTOWANIA

- Lipidy osocza: triacyloglicerole, cholesterol wolny i zestryfikowany, fosfolipidy, wolne kwasy tłuszczowe - budowa i właściwości
- Lipoproteiny - typy frakcji, miejsce powstawania, skład, przemiany i funkcje: chylomikrony, lipoproteiny o bardzo małej gęstości (VLDL), lipoproteiny o małej gęstości (LDL), lipoproteiny o dużej gęstości (HDL)
- Enzymy hydrolizujące triacyloglicerole w przewodzie pokarmowym i we krwi (lipaza lipoproteinowa, lipaza wątrobową), rola żółci
- Enzymy estryfikujące cholesterol (acylotransferaza acylo-CoA:cholesterol (ACAT), acylotransferaza lecytynowo-cholesterolowa (LCAT), hydrolaza estrów cholesterolu (esteraza cholesterolowa), występowanie i funkcja
- Białko przenoszące estry cholesterolu (CETP), lipemia poposiłkowa, hiperlipoproteinemia

## 1. Badanie właściwości lipidów

### 1.1. Rozpuszczalność tłuszczowców

**Zasada:** Tłuszcze nie rozpuszczają się w wodzie, ulegają natomiast emulgacji przy zmniejszonym napięciu powierzchniowym przez detergent, zarówno naturalny (żółć) jak i syntetyczny. W etanolu tłuszcze rozpuszczają się słabo, natomiast bardzo dobrze rozpuszczają się w chloroformie i innych rozpuszczalnikach niejonizujących.

**Wykonanie:**

Przygotować 4 probówki, ponumerować je i do każdej wlać po 0.5 ml oleju.

Następnie: do 1 probówki wlać 2 ml H<sub>2</sub>O,

do 2 probówki wlać 2 ml detergentu

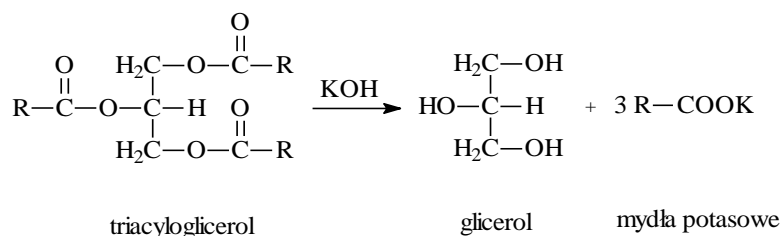
do 3 probówki wlać 2 ml etanolu

do 4 probówki wlać 2 ml chloroformu

Probówki wstrząsać przez kilka minut, wstawić do statywu i obserwować rozpuszczalność tłuszczów. Zinterpretować uzyskane wyniki.

### 1.2. Zmydlanie tłuszczów, odczyn na obecność kwasów tłuszczowych

**Zasada:** Reakcja zmydlania, czyli hydrolizy tłuszczów – zarówno prostych, jak i fosfolipidów – zachodzi łatwo w środowisku zasadowym. Produktami reakcji, poza alkoholem, są mydła, czyli sole wyższych kwasów tłuszczowych.



Mydła potasowe i sodowe są rozpuszczalne w wodzie. Jako sole słabych kwasów oraz mocnych zasad wykazują odczyn zasadowy. Mydła rozpuszczalne w wodzie są substancjami powierzchniowo czynnymi, czyli detergentami. Natomiast mydła wapniowe lub magnezowe są nierozpuszczalne w wodzie i wytrącają się z roztworu.

**Wykonanie:**

Przygotować 3 suche probówki, do jednej wprowadzić: 0,2 ml oleju i 5 ml 10% alkoholowego roztworu KOH. Następnie ogrzewać probówkę we wrzącej łaźni wodnej do otrzymania około 2 ml opalizującego roztworu, po odparowaniu alkoholu (po 10 min). Wstrząsnąć delikatnie probówką, pienie się roztworu świadczy o obecności w nim mydła.

**Następnie otrzymany roztwór mydeł rozdzielić równo do dwóch probówek:**

Następnie do jednej probówki dodać około 0,2 ml 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, do uzyskania odczynu kwaśnego (sprawdzić wobec papierka wskaźnikowego). W tych warunkach wytrącają się nierozpuszczalne w wodzie kwasy tłuszczowe. Odląć płyn nad osadu, dodać wody dla sprawdzenia rozpuszczalności w wodzie.

Do drugiej probówki dodać 0,2 ml 1 M roztwór CaCl<sub>2</sub> do pojawienia się osadu nierozpuszczalnych w wodzie mydeł wapniowych. Odląć płyn nad osadu, dodać wody dla sprawdzenia rozpuszczalności. Zinterpretować uzyskane wyniki.

## 2. Identyfikacja lipidów w surowicy

Cholesterol jest najważniejszym steroidem zwierzęcym, transportowanym we krwi w kompleksach z białkami (lipoproteiny). W stanie fizjologicznym występuje we wszystkich komórkach zwierzęcych jako składnik błon biologicznych, z wyjątkiem błon mitochondrialnych. W cytoplazmie obecny jest w postaci estrów cholesterolu z kwasami tłuszczowymi. Najbogatsze w cholesterol są nadnercza i mózg. Stwierdza się go również w osłonkach mielinowych.

Hipercholesterolemia (wysoki poziom cholesterolu całkowitego i lipoprotein klasy LDL we krwi) przyspiesza rozwój zmian miażdżycowych w naczyniach tętniczych, sprzyjając chorobie niedokrwiennej serca i ostrym incydentom sercowo-naczyniowym takim jak zawał mięśnia sercowego oraz udar niedokrwienno mózgu. Specjaliści ze światowych towarzystw kardiologicznych wyliczyli, że 10% redukcja stężenia cholesterolu całkowitego związana jest z 25% obniżeniem ryzyka wystąpienia choroby niedokrwiennej serca w ciągu 5 lat ekspozycji. Z tego powodu analiza lipidów (tzw. lipidogram) osocza lub surowicy jest rutynowym badaniem biochemicznym u osób z podejrzeniem chorób sercowo-naczyniowych. Analiza lipidów osocza powinna być także okresowym badaniem kontrolnym u osób powyżej 55 roku życia, ponieważ zmiany miażdżycowe nasilają się wraz z wiekiem i powstają zazwyczaj bezobjawowo (do 50% zwężenia naczynia). Podstawowy lipidogram obejmuje badanie stężenia cholesterolu całkowitego (TC), cholesterolu frakcji HDL oraz triacylogliceroli (TG). Stężenie cholesterolu frakcji LDL oblicza się na podstawie wzoru Friedewalda:

$$LDL = TC - HDL - (TG/5)$$

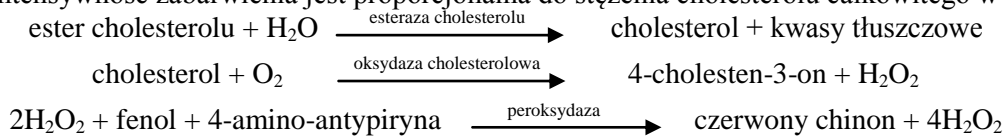
Zgodnie z rekomendacjami światowych towarzystw kardiologicznych ryzyko chorób sercowo-naczyniowych związane jest ze stężeniami:

TC	>	190 mg/dL (5 mmol/L)
LDL	>	115 mg/dL (3 mmol/L)
HDL	<	40 mg/dL (1.0 mmol/L) u mężczyzn
	<	45 mg/dL (1.2 mmol/L) u kobiet
TG	>	150 mg/dL (1.7 mmol/L)

### 2.1. Identyfikacja i oznaczanie stężenia cholesterolu całkowitego metodą enzymatyczną.

#### Zasada:

Cholesterol całkowity oznaczany jest w reakcjach katalizowanych przez esterazę cholesterolu, oksydazę cholesterolową i peroksydazę. W wyniku ciągu reakcji (przedstawionych poniżej) powstaje barwny kompleks (czerwony chinon), którego intensywność zabarwienia jest proporcjonalna do stężenia cholesterolu całkowitego w surowicy.



#### Wykonanie:

- Przygotować 3 próbki, ponumeruj je i do każdej wprowadź kolejne odczynniki zgodnie z tabelą 1.

	Próba ślepa	Próba wzorcowa	Próba badana
Odczynnik roboczy	1000 µl	1000 µl	1000 µl
Woda	10 µl	-	-
Wzorzec	-	10 µl	-
Surowica	-	-	10 µl

- Próbki inkubuj w temp. pokoj. przez 5 minut a następnie odczytaj wartość absorbancji (A) próbki badanej i wzorcowej wobec próby ślepej przy długości fali 500 nm.
- Obliczyć wyniki według wzoru:

$$[\text{mg/dl}] = \frac{A \text{ surowicy}}{A \text{ wzorca}} \times \text{stężenie wzorca}$$

$$\text{Współczynnik przeliczeniowy: } \text{mg/dl} \times 0,0259 = \text{mmol/L}$$

### 2.2. Oznaczanie stężenia cholesterolu frakcji HDL metodą enzymatyczną.

#### Zasada:

Obecne w surowicy chylomikrony, cholesterol małej gęstości (LDL) i bardzo małej gęstości (VLDL) są wytrącane kwasem fosforowolframowym i jonami magnezu. Po odwirowaniu cholesterol dużej gęstości (HDL) pozostaje w supernatancie. Stężenie cholesterolu w supernatancie oznacza się metodą enzymatyczną przedstawioną powyżej.

### Wykonanie:

- **Izolowanie frakcji HDL:** Do próbki dodać kolejno 200 µl surowicy i 40 µl odczynnika strącającego. Wymieszać, odstawić na 10 min., następnie odwirować przy 5 tys. obrotów/ min. przez 15 minut.
- **Oznaczenie poziomu HDL:** W uzyskanym supernatancie oznaczyć poziom cholesterolu całkowitego, korzystając z odczynnika roboczego z poprzedniego ćwiczenia według poniższej instrukcji.
- Przygotować 3 próbki:  
Do każdej próbki wprowadzić odczynniki wg tabeli 2.

Tabela 2.

	Próba ślepa	Próba wzorcowa	Próba badana (supernatant)
Odczynnik roboczy	1000 µl	1000 µl	1000 µl
Woda	50 µl	-	-
Wzorzec HDL	-	50 µl	-
Supernatant	-	-	50 µl

- Probówki inkubuj w temp. pok. przez 5 minut a następnie odczytaj wartość absorbancji (A) próbki badanej i wzorcowej wobec ślepej przy długości fali 500 nm.
- Obliczyć wyniki według wzoru:

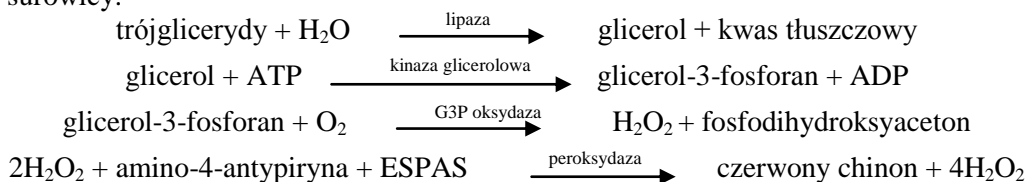
$$[\text{mg /dl}] = \frac{A \text{ surowicy}}{A \text{ wzorca}} \times \text{stężenie wzorca} \times 1,1 \text{ (współczynnik rozcieńczenia próby)}$$

$$\text{Współczynnik przeliczeniowy: } \text{mg /dl} \times 0,0259 = \text{mmol/L}$$

### 2.3. Identyfikacja i oznaczenie stężenia triacylogliceroli w surowicy metodą enzymatyczną.

#### Zasada:

Triacyloglicerole (trójglicerydy) są oznaczane po enzymatycznej hydrolizie lipazą. W wyniku ciągu reakcji enzymatycznych powstaje barwny kompleks, którego intensywność zabarwienia jest proporcjonalna do stężenia trójglicerydów w surowicy.



#### Wykonanie:

- Przygotuj 3 próbki, ponumeruj je i do każdej wprowadź kolejne odczynniki zgodnie z tabelą 3:

Tabela 3.

	Próba ślepa	Próba wzorcowa	Próba badana
Odczynnik roboczy	1000 µl	1000 µl	1000 µl
Woda	10 µl	-	-
Wzorzec	-	10 µl	-
Surowica	-	-	10 µl

- Probówki inkubuj w temp. pok. przez 5 minut a następnie odczytaj wartość absorbancji (A) próbki badanej i wzorcowej wobec ślepej przy długości fali 546 nm.
- Obliczyć wyniki według wzoru:

$$[\text{mg /dl}] = \frac{A \text{ surowicy}}{A \text{ wzorca}} \times \text{stężenie wzorca}$$

$$\text{Współczynnik przeliczeniowy: } \text{mg /dl} \times 0,0113 = \text{mmol /L}$$

#### Polecana literatura:

1. „Chemia medyczna” pod redakcją Iwony Żak, wyd. ŚLAM, Katowice 2001, rozdziały 11 i 12 oraz w rozdziale 15 str. 265-268.
2. „Biochemia; krótkie wykłady” B.D. Hames N.M. Hooper, PWN, Warszawa, Sekcja K (K2, K3, K4, K6).
3. Lipidy i lipoproteiny osocza. A. Michajlik, E. Bartnikowska, PZWL Warszawa.