

## PROTOKOL ZA ODREĐIVANJA KONCENTRACIJE HOLESTEROLA U KRVNOM SERUMU PACIJENTA

Holesterol je lipidni molekul sa stearinskim prstenom. Sam kolesterol ulazi u sastav ćelijske membrane, a njegovi derivati u organizmu su žučne kiseline, steroidni hormoni i vitamin D. Holesterol u LDL (frakcija lipoproteina krvne plazme) impliciran je u nastanku ateromatoze, patološkog poremećaja arterijskih krvnih sudova, i stoga je standardni deo svih kliničkih biohemijskih panela

Određivanje holesterola u krvnom serumu je spektrofotometrijska (kolorimetrijska) metoda u kojoj se meri intenzitet obojenja molekulskih kompleksa nastalih delovanjem anhidrida sirćetne kiseline i sumporne kiseline na kolesterol u hloroformnom rastvoru.

	<b>REDOSLED KORAKA PRI IZVOĐENJU METODE</b>	<b>KRATKO OBJAŠNJENJE</b>
1.	U konusnu epruvetu sipati 8 mL <b>96% alkohola</b> , 2 mL <b>etra</b> i <b>uzorak</b> - 200 µL krvnog seruma	<b>Ekstrakcija holesterola</b> iz uzorka: <b>Alkohol</b> taloži proteine, a kolesterol iz uzorka koji se ispituje se rastvara u <b>etru</b> .
2.	Položenu epruvetu ostaviti 30 minuta na sobnoj temperaturi	
3.	<b>Centrifugovati</b> 10 minuta na 2500 obrtaja u minuti	Denaturisani proteini iz uzorka se "sabijaju" u talog, a kolesterol ostaje u bistrom supernatantu. Izdvajanjem supernatanta uklonjeni su proteini koji bi smetali pri merenju.
4.	<b>Odliti bistri deo tečnosti</b> u erlenmajer od 50 mL, paziti da se ne podigne talog	
5.	Odstraniti svu tečnost iz erlenmajera <b>uparavanjem</b> u vodenom kupatilu u digestoru	Otklanjanje rastvarača se odvija u digestoru, jer je etar lako isparljiv i ima anestetička svojstva. Suv kolesterol ostaje na zidovima suda.
6.	U erlenmajer dodati 5 mL <b>hloroforma</b> , 2 mL <b>anhidrida sirćetne kiseline</b> i 5 kapi <b>koncentrovane sumporne kiseline</b>	Hloroform rastvara kolesterol. Anhidrid sirćetne kiseline oduzima vodu i oksiduje kolesterol. Nastali ciklični nezasićeni ugljovodonik se kondenzuje u duže nizove i sa koncentrovanom sumpornom kiselinom daje zeleno obojene proizvode kompleksne strukture.
7.	Ostaviti u <b>termostat</b> na 37 °C 7 minuta u mraku	Razvijanje i stabilizacija boje. Cilj je da se dobije stabilno zeleno obojenje rastvora u kojem je intenzitet obojenja proporcionalan koncentraciji holesterola.
8.	<b>Kolorimetrija</b> . Očitati vrednost absorbanse na spektrofotometru pri $\lambda=660$ nm	
9.	<b>Izračunati vrednost koncentracije holesterola</b> unošenjem očitanih vrednosti adsorbansi $A_{uz}$ i $A_{st}$ . $C = \frac{A_{uz}}{A_{st}} \times 250 \times 10 \text{ (mg/L)}$	<b><math>A_{uz}</math></b> - absorbansa <b>uzorka</b> , <b><math>A_{st}</math></b> - absorbansa <b>standarda</b>