

Pentru întrebări legate de tematica abordată în cadrul lucrării practice va adresati cadrelor didactice de predare la lucrări, la următoarele adrese de mail:

- 1) SL Dr. Grecu Daniela – mail: grecu.daniela@umft.ro
- 2) As. Univ. Dr. Bujor Cristiana – mail: bujor.cristiana@umft.ro
- 3) As. Univ. Chis Aimee – mail: chis.aimee@umft.ro
- 4) As. Univ. Moatar Alexandra – mail: moatar.alexandra@umft.ro

LUCRARE PRACTICA 6 BIOCHIMIE AMG

EVALUAREA METABOLISMULUI LIPIDIC

În sânge, compușii de natură lipidică sunt transportați sub forma **fracțiunilor lipoproteice (chilomicroni, HDL, LDL, VLDL)**. În mod normal, chilomicronii sunt prezenți în sânge postprandial, un timp limitat, iar VLDL în urme. Pentru evaluarea metabolismului lipic, se determina uzual **profilului lipidic**, compus din **determinarea colesterolului total (conținutul de colesterol din toate fracțiunile lipoproteice prezente în sânge), HDL-colesterolului (conținutul de colesterol din fracțiunea HDL), LDL-colesterolului (conținutul de colesterol din fracțiunea LDL) și trigliceridelor (conținutul de trigliceride din toate fracțiunile lipoproteice prezente în sânge)**.

Pentru efectuarea profilului lipidic, se recoltează sânge venos, a jeune, cel mai frecvent în recipient cu dop roșu. Dacă recoltarea sângelui se realizează la scurt timp după aportul alimentar, valoarea trigliceridelor va fi fals crescută datorită prezenței în sânge a fracțiunii lipoproteice care vehiculează lipidele provenite din aportul alimentar și care are cel mai mare conținut de trigliceride (chilomicronii). Totodată, concentrația crescută de trigliceride determină modificarea aspectului serului cu apariția opalescenței acestuia (ser lipemic), în grade variate în funcție de concentrația trigliceridelor (de la ușor opalescent până la intens lactescent). Opalescența serului poate fi sesizată de la concentrația trigliceridelor de 300 mg/dL. Serul lipemic este un important factor de interferență pentru alte determinări de laborator. Valorile crescute ale colesterolului nu modifică aspectul serului.

Intervalele biologice de referință pentru parametrii metabolismului lipidic sunt:

- colesterol seric total: 150 – 200 mg/dL
- HDL-colesterol > 35 mg/dL la bărbați și > 45 mg/dL la femei
- LDL-colesterol < 130 mg/dL

- trigliceride serice < 165 mg/dL la bărbați și < 140 mg/dL la femei

Interpretarea valorilor parametrilor metabolismului lipidic se face în legătura cu riscul aterogen (riscul de apariție a bolilor cardio-vasculare). Creșterea concentrației colesterolului seric total, a trigliceridelor și a LDL-colesterolului, alături de scăderea HDL-colesterolului se constituie în factori de risc aterogen crescut.

Separarea fracțiunilor lipoproteice

Lipoproteinele plasmatice se pot separa prin ultracentrifugare și electroforeză.

Ultracentrifugarea

Ultracentrifugarea se bazează pe **diferențele de densitate ale fracțiunilor lipoproteice în raport cu conținutul acestora în lipide și proteine**. În câmpuri gravitaționale puternice (aprox. 100000g) în raport cu densitatea mediului, lipoproteinele vor sedimenta (dacă au densități mai mari decât mediul) sau vor flota (dacă au densități mai mici). Prin această metodă, într-un mediu tampon cu densitatea de 1,063 g/cm³ (densitate ce corespunde unei lipoproteine cu conținut egal de lipide și proteine) se separa 4 fracțiuni:

- chilomicronii
- VLDL (Very Low Density Lipoproteins)
- LDL (Low Density Lipoproteins)
- HDL (High Density Lipoproteins)

Electroforeza

Lipoproteinele plasmatice migrează în câmp electric deoarece proteinele și fosfolipidele poartă sarcini electrice. După separare, fracțiunile se vizualizează cu coloranți specifici. Fracțiunile separate prin electroforeză constituie electroforegrama lipoproteinelor serice:

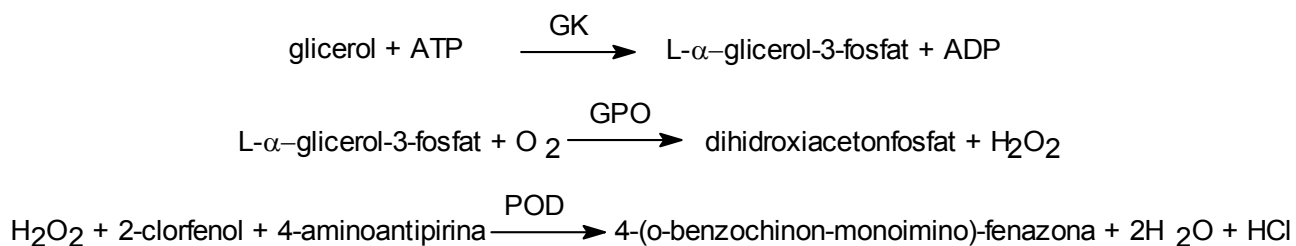
- chilomicronii (practic nu migrează din cauza conținutului mic de proteine și fosfolipide)
- β-lipoproteine (corespund LDL)
- pre-β-lipoproteine (corespund VLDL)
- α-lipoproteine (corespund HDL și migrează cel mai mult deoarece au conținutul cel mai ridicat de proteine și fosfolipide)

În prezent, pentru determinarea colesterolului total și a trigliceridelor se utilizează **metode enzimatice**, în care, serul pacientului este pus în contact cu reactivi specifici (conțin anumite enzime ce acționează asupra colesterolului sau a trigliceridelor) iar în urma reacțiilor enzimatice apar compuși colorați care absorb radiație luminoasă de o anumită lungime de undă. În continuare sunt exemplificate aceste metode.

Determinarea trigliceridelor (triacilglicerolilor)

Principiu

Triacilglicerolii sunt hidrolizați enzimatic la glicerol și acizi grași liberi de către lipaze specifice. Glicerolul reacționează apoi conform reacțiilor:



unde: GK – glicerol kinaza; GPO – glicerolfosfat-oxidaza; POD – peroxidaza

Mod de lucru

Se pipetează în trei eprubete conform tabelului:

Reactivi, μl	Probă	Standard	Martor
Amestec reactiv	500	500	500
Standard de trigliceride (200 mg/dL)	-	300	-
Ser	300	-	-
Apă distilată	-	-	300

Se agită, se incubează 5 minute la 37°C. Se măsoară absorbțiile de lumină E_p și E_s la lungimea de undă de 546 nm, față de martor, în interval de 60 de minute.

Calcul: trigliceride (mg/100ml) = (E_p/E_s) x 200

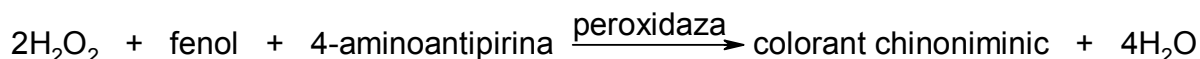
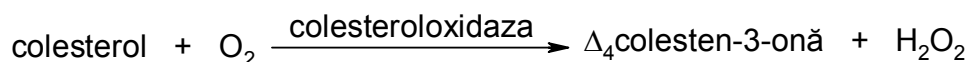
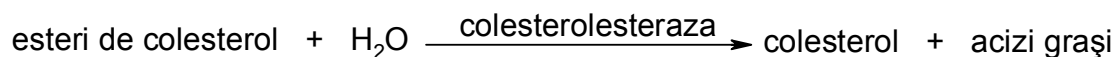
Semnificație clinică

Triacilglicerolii serici cresc în: hiperlipoproteinemii primare si secundare (diabet zaharat, obezitate, hipotiroidie

Determinarea colesterolului seric

Principiu

Colesterol esteraza hidrolizează esterii, iar colesterol oxidaza oxidează colesterolul cu formare de apă oxigenată. Aceasta oxidează fenolul și 4-aminoantipirina, în prezența peroxidazei, la un compus colorat chinoniminic (culoare roșie).



Mod de lucru

Se pipetează conform tabelului următor:

Reactivi, μl	Probă	Standard	Martor
Reactiv de lucru	1000	1000	1000
Ser	100	-	-
Standard de colesterol	-	100	-
Apă distilată	-	-	100

Se agită, se incubează 5 minute la 37°C sau 10 minute la temperatura camerei. Se măsoară absorbțiile de radiație E_p și E_s față de martor, la 546 nm, în decurs de 60 minute.

Calcul: colesterol total (mg/100 ml) = ($E_{\text{probă}}/E_{\text{standard}}$) x concentrația standard

Semnificație clinică

Valori crescute: hiperlipoproteinemie primare si secundare (diabet zaharat, obezitate, hipotiroidism)

Determinarea HDL-colesterolului

Pentru determinarea HDL-colesterolului, în prima etapă celelalte fracțiunile lipoproteice sunt transformate în componente nereactive printr-o reacție specifică. În a doua etapă, se determină conținutul de colesterol din HDL folosind aceeași metodă de la determinarea enzimatică a colesterolului total.

Determinarea din fracțiunea LDL-colesterolului

LDL-colesterolul poate fi determinat direct prin metode enzimatică și indirect prin calcul, cu ajutorul **formulei lui Friedewald**, utilizând valoarea serică a colesterolului total, a HDL-colesterolului și a trigliceridelor.

$$\text{LDL-colesterol} = \text{colesterol total} - (\text{HDL-colesterol}) - (\text{trigliceride}/5)$$

Formula nu se aplică în cazul trigliceridelor >400mg/dl, când se recomandă determinarea LDL-colesterolului prin metode enzimatică.

DETERMINAREA CORPILOR CETONICI

Corpii cetonici sunt reprezentați de **acidul acetoacetic**, **acidul β-hidroxibutiric** și **acetona**. Se formează prin procesul de cetogeneza, un proces de transformare metabolică a acetyl-CoA. În condiții normale, **producția de corpi cetonici este scăzută**, concentrația sanguină fiind de **1 mg/100 ml**. Eliminarea urinară este minimă (**10 mg/24 ore**), astfel încât reacția pentru corpii cetonici este negativă. **Acetyl-CoA** poate proveni în organism din **acizi grași**, prin beta oxidare, **glucoză**, prin catabolism aerob și din aminoacizi. Corpii cetonici sunt compuși ce se formează cu precădere în cursul catabolismului lipidic, procesul fiind în strânsă legătură cu metabolismul glucidic.

Mecanismul hiperproducției de corpi cetonici presupune o intensă lipoliză în țesutul adipos, cu eliberare crescută de acizi grași, așa cum se întâmplă atunci când există un deficit de insulină sau aportul de glucoză este scăzut. Acizii grași eliberați sunt apoi utilizați de țesuturi (cu excepția creierului și a hematocitelor) ca material de satisfacere a necesităților energetice. În ficat, în aceste condiții, se sintetizează cantități crescute de corpi cetonici, care vor constitui alternativa energetică pentru toate țesuturile, inclusiv pentru creier.

În cazul *aportului scăzut de glucoză (inaniție)*, creșterea producției de corpi cetonici reprezintă o adaptare metabolică, corpii cetonici reprezentând o sursă de energie utilizată pentru a suplini glucoza. În aceste condiții, glucoza este oxidată numai de celulele strict dependente de ea, restul țesuturilor utilizând substraturi energetice alternative (corpi cetonici, acizi grași). Glucagonul, catecolaminele și glucocorticoizii sunt principalii hormoni ce coordonează reacțiile de mobilizare ale rezervelor energetice, iar țesutul adipos îndeplinește rolul cheie în furnizarea de substraturi energetice.

Acetona este un **compus caracteristic cetogenezei patologice** și este o substanță volatilă, ce se elimină prin plămâni, motiv pentru care aerul expirat de bolnavii diabetici are un miros caracteristic.

Cetoza este starea patologică caracterizată prin sinteza hepatică crescută de acetoacetat, sinteză ce depășește capacitatea țesuturilor extrahepatice de a utiliza corpii cetonici și care are drept urmare creșterea cetonemiei și apariția cetonuriei. Pentru că eliminarea corpurilor cetonice se face sub formă de săruri, ei consumă rezerva alcalină a organismului și apare acidoza.

Aplicație practică

Evidențierea corpurilor cetonice în urină

Corpuri cetonice se pot evidenția în urina proaspăt emisă cu ajutorul stripurilor urinare sau prin metoda Legal-Imbert.

Principiul metodei Legal-Imbert

Corpuri cetonice (acidul acetoacetic și acetona; acidul beta-hidroxibutiric nu reacționează) din urină dau cu nitroprusiatul și amoniacul un amestec de culoare violetă.

Mod de lucru

Într-o eprubetă se introduc 2 ml urină filtrată. Se adaugă 5-6 picături reactiv Legal-Imbert și se omogenizează. Pe peretele interior al eprubetei se preling 7-8 picături amoniac concentrat astfel încât să se formeze un strat la suprafața urinei. Se lasă eprubeta în stativ 15 minute.

Apariția unui **inel violet** la interfața dintre cele 2 lichide indică prezența corpurilor cetonice.