

METABOLISMUL LIPIDIC

DETERMINAREA TRIACILGLICEROLILOR SERICI

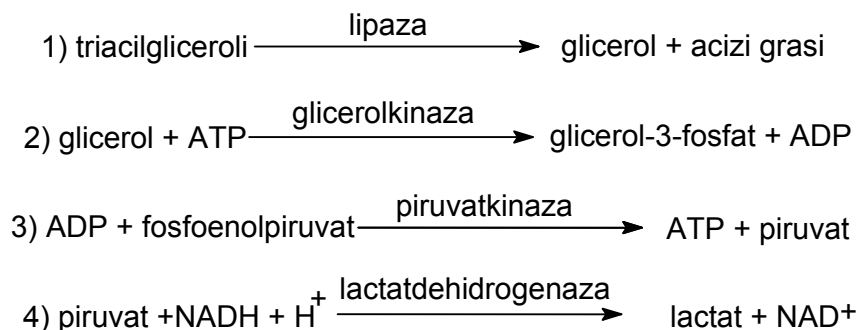
Introducere

Triacilglicerolii, numiți și grăsimi neutre nu dau o reacție specifică de recunoaștere, de aceea nici determinarea lor nu se poate face ca atare, ci fie folosind o cale indirectă de determinare, prin calcul, fie o cale directă în care se determina însă numai o parte componentă a moleculei prin intermediul căreia se calculează apoi cantitatea de compus.

Determinarea triacilglicerolilor serici sau plasmatici se folosește pentru evaluarea și diagnosticul diferențial al hiperlipidemiilor primare sau secundare și pentru evaluarea factorilor de risc ai pancreatitei acute.

Metodele folosite actual au la bază determinarea glicerolului din triacilgliceroli, determinare care poate avea la bază tehnici chimice sau enzimatice.

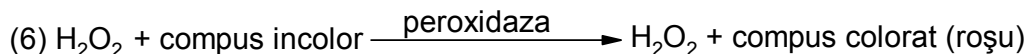
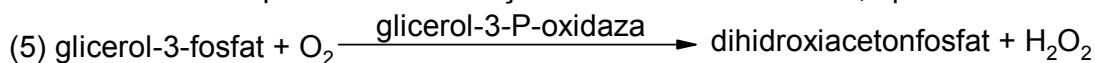
Tehnicile enzimatice folosite actual au la bază o secvență de reacții enzimatice redată în continuare, în fiecare situație existând o enzimă caracteristică metodei respective. Pentru tehnica care folosește piruvatkinaza, cu măsurare finală în ultraviolet, secvența de reacții este:



Scăderea absorbției de radiație la 340 nm este direct proporțională cu nivelul triacilglicerolului seric.

Tehnicile care folosesc glicerolfosfatoxidaza au la bază următoarea secvență de reacții:

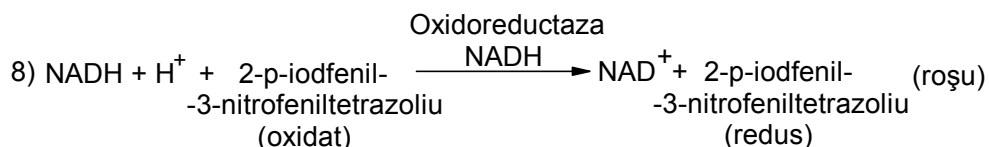
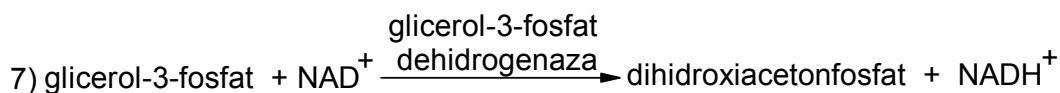
Se realizează primele două reacții ca în tehnica de mai sus, apoi urmează:



Intensitatea culorii este direct proporțională cu nivelul triacilglicerolemiei.

Metodele în care enzima caracteristică este glicerolfosfat dehidrogenaza (GPD) au următoarea secvență de reacții:

Primele două reacții sunt identice cu reacțiile 1 și 2, apoi urmează:



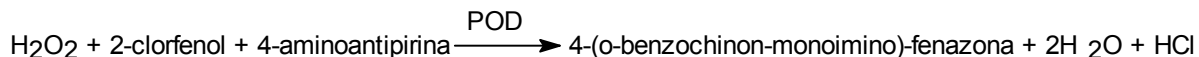
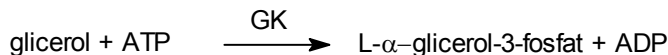
Producția de compus colorat este direct proporțională cu nivelul triacilglicerolemiei.

Partea experimentală

Determinarea triacilglicerolilor în ser prin metoda enzimatică

Principiu

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



unde:

GK – glicerolkinaza; GPO – glicerolfosfatoxidaza; POD – peroxidaza

Reactivi

1. Tampon PIPES [acid piperazin-N,N'-bis-(2-etansulfonic)], 0,1 M, pH = 7,5
 2. Amestec reactiv (acetat Mg – 12,8 mM; 4-aminoantipirina – 1mM; ATP – 2 mM; 2 – clorofenol – 2mM; peroxidaza – 1 U/ml; glicerolkinaza – 0,2 U/ml; glicerolfosfat – oxidaza – 1,5 U/ml; lipaza – 10 U/ml; polietilenglicol-monoetileter – 2 g/l.
 3. Soluție standard triacilgliceroli – 200 mg%;
 4. Material biologic: ser sau plasmă (sânge recoltat pe EDTA sau heparină);
- Serul și soluția standard trebuie diluate 1/10.

Mod de lucru

Se pipetează în trei eprubete de format potrivit, notate P(probă) și S(standard) și M (martor) conform tabelului:

Reactivi (μl)	P	S	M
Ser	100	–	–
Soluție standard	–	100	–
Apă distilată	–	–	100
Amestec reactiv	1000	1000	1000

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 pe o durată de 60 de minute.

Calcul

$$\text{mg\% triacilgliceroli} = \text{EP} / \text{ES} \times 200$$

Liniaritatea se respectă pentru concentrații de până la 800 mg triacilglicerol/100 ml ser. Pentru concentrații mai mari serul se diluează corespunzător cu ser fiziologic.

Valori normale:

femei 40 – 140 mg/100 ml ser

bărbați 60 – 165 mg/100 ml ser

Semnificație clinică

Triacilglicerolii serici cresc în: hiperlipoproteinemii primare cu excepția tipului IIa, infarct miocardic, diabet zaharat, obezitate, hipotiroidie, boli hepatice, icter obstructiv, sindrom nefrotic, sarcină, tratament cu cortizol, tratament cu estrogeni.

Triacilglicerolii serici scad în : anemii severe, boli consumptive, marasm, inanție, hipertiroidism, arsuri, enteropatie exudativă.

Cetogeneza

Introducere

Cetogeneza este un proces de transformare metabolică a acetil-CoA în corpi cetonici.

Acetil-CoA poate proveni în organism din: **acizi grași**, prin beta oxidare, **glucoză**, prin catabolism aerob și din aminoacizi. Este utilizată în **sinteza de acizi grași** și triacilgliceroli, **în sinteza de colesterol** și în **cetogeneză**. Corpii cetonici sunt compuși ce se formează cu precădere în cursul catabolismului lipidic, procesul fiind în strânsă legătură cu metabolismul glucidic.

Corpii cetonici sunt reprezentați de :

- **Acidul acetoacetic**
- **Acidul beta hidroxibutiric**
- **Acetona**

Cetogeneza se desfășoară în exclusivitate în ficat, în mitocondriile hepatocitului, produsul primar fiind acidul acetoacetic.

Acetoacetatul reprezintă pentru ficat un metabolit inert ce nu poate fi catabolizat pentru că ficatul nu dispune de echipamentul enzimatic necesar activării acetoacetatului (succinil-CoA-acetoacetat-CoA transferaza).

Țesuturile extrahepatice (țesutul muscular scheletic, miocard, țesutul renal și țesutul nervos) pot utiliza energogen acetoacetatul și betahidroxibutiratul. Corpii cetonici sunt substrat energogen utilizat în eforturile prelungite, foame, situații când glucoza este cruțată în favoarea țesuturilor strict dependente de ea.

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.

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 corpi cetonici este negativă.

Când există un deficit de insulina sau aportul de glucoza este scăzut producția de corpi cetonici crește.

În cazul aportului scăzut de glucoză (inanție), creșterea producției de corpi cetonici reprezintă o adaptare metabolică, corpi 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.

Mecanismul hiperproducției de corpi cetonici presupune o intensă lipoliza în țesutul adipos, cu eliberare crescută de acizi grași. Acizii grași eliberați sunt apoi utilizați de țesuturi (cu excepția creierului și a hematiilor) 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.

Diabetul zaharat, stare patologică caracterizată prin deficit relativ sau absolut de insulină, se caracterizează prin prevalența lipolizei în țesutul adipos și creșterea acizilor grași liberi în sânge. În ficat, aceasta determină într-o prima etapa, sinteza sporită de triacilgliceroli endogeni (hipertriacilglicerolemie endogenă, triacilglicerolii fiind incluși în VLDL și retrimiși în circulație) iar apoi hiperproducție de corpi cetonici (cetonemie-cetoza) și infiltrație grasă.

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

Partea experimentală

Evidențierea corpilor cetonici în urină

Principiu

Se utilizează metoda Legal-Imbert (de evidentiere a acidului acetilacetic și acetonei). Corpii cetonici din urină dau cu nitroprusiatul și amoniacul un amestec de culoare violetă.

Reactivi și materiale:

1. Urina proaspătă de dimineață
2. Reactiv Legal-Imbert: nitroprusiat de sodiu + acid acetic glacial
3. Soluție amoniac 25%

Mod de lucru

Într-o eprubetă de hemoliză 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 indica prezenta corpilor cetonici.