

## LP7. DETERMINAREA COLESTEROLULUI TOTAL ȘI A COLESTEROLULUI DIN FRAȚIUNI. SEPARAREA FRAȚIUNILOR LIPOPROTEICE PLASMATICE

### Introducere

Lipoproteinele plasmatică sunt forme de transport a lipidelor din sânge. Ele transportă lipidele insolubile în apă între diferite organe pe cale sanguină. Sunt structuri lipo-lipoido-proteice, formate dintr-o *componentă lipidică* (triacilglicerolilor, colesterol, fosfolipide) și o *componentă proteică* (apoproteine). Grupările polare ale proteinelor și fosfolipidelor sunt dispuse la suprafața complexelor, conferindu-le caracter hidrofil.

Metodele de separare a lipoproteinelor plasmatică se împart în:

### A. Metode fizico-chimice

**1. 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 tampon cu densitatea de 1,063 g/cm<sup>3</sup> (densitate ce corespunde unei lipoproteine cu conținut egal de lipide și proteine) au fost separate 4 fracțiuni:

- chilomicronii  $d \leq 0,96$  g/cm<sup>3</sup>;
- VLDL (**V**ery **L**ow **D**ensity Lipoproteins)  $d = 0,96-1,006$  g/cm<sup>3</sup>;
- LDL (**L**ow **D**ensity Lipoproteins)  $d = 1,006-1,063$  g/cm<sup>3</sup>;
- HDL (**H**igh **D**ensity Lipoproteins)  $d = 1,063-1,21$  g/cm<sup>3</sup>.

**2. Electroforeza**-lipoproteinele plasmatică migrează în câmp electric deoarece proteinele și fosfolipidele poartă sarcini electrice. Separarea se efectuează la un pH de 8,6 iar 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;
- $\beta$ -lipoproteine-corespund LDL;
- pre- $\beta$ -lipoproteine-corespund VLDL;
- $\alpha$ -lipoproteine-corespund HDL-migrează cel mai mult deoarece au conținutul cel mai ridicat de proteine și fosfolipide.

**În serul normal, recoltat după 8-10 ore de post alimentar, nu apar chilomicronii, iar VLDL (pre- $\beta$ ) apare doar în urme.**

Separarea lipoproteinelor ca entități morfofuncționale a permis înțelegerea dinamicii lipidelor din sânge, geneza și modul lor de utilizare.

Cum urmărirea strictă a unui component lipidic din sânge nu dă informații satisfăcătoare în privința semnificației unor eventuale modificări funcționale prin separarea lipoproteinelor și determinarea componentului lipidic în fracțiunea separată, se obțin informații cu valoare mai ridicată.

*Există și posibilitatea separării fracțiunilor prin gel-filtrare precum și precipitarea cu anticorpi pentru apoproteinele complexelor.*

## B. Metodele enzimatice de determinare a colesterolului seric

Colesterolul este prezent în toate țesuturile animale, în general sub formă de esteri cu diverși acizi grași.

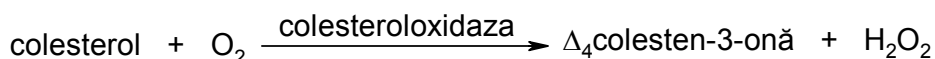
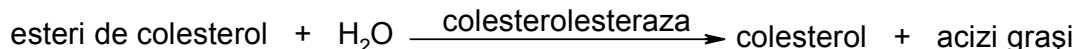
Determinarea colesterolului total este recomandată pentru:

- monitorizarea factorilor de risc pentru boala coronariană;
- screening-ul dislipidemiilor primare și secundare;
- monitorizarea tratamentului dislipidemiilor.

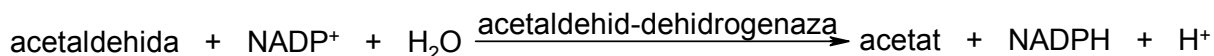
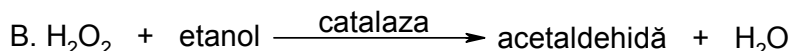
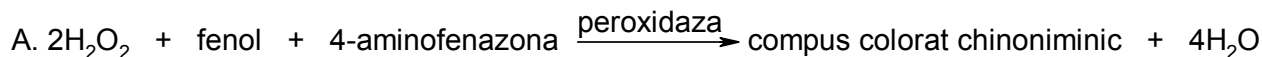
În practică, pentru determinarea colesterolului se folosesc o varietate mare de metode, bazate pe principii diferite. Se preconizează ca, într-o perspectivă apropiată, în laboratoare să fie folosite doar metode bazate pe tehnici enzimatice.

Multe metode folosite pentru determinarea colesterolului în ser, plasmă și sânge au la bază procedee enzimatice.

Principal, o **tehnică enzimatică** cuprinde etapele:



În continuare, apa oxigenată poate fi inclusă în una din cele două reacții (A sau B):



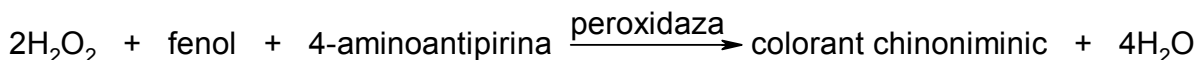
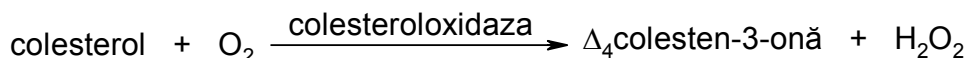
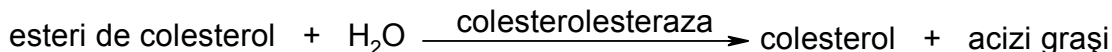
Se pot analiza probe de *ser* sau *plasmă*. Pentru plasmă se preferă ca *anticoagulant heparina*. Anticoagulanții cum sunt fluorura, citratul sau oxalatul cauzează erori, datorită diluției realizate ca urmare a efluxului apei din eritrocite în plasmă.

### Aplicație practică

#### 1. Determinarea colesterolului total prin metode enzimatice

##### Principiu

Colesterolul și esterii lui sunt eliberați din lipoproteinele de transport prin tratare cu agenți tensioactivi. 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.



### Reactivi

1. Reactiv 1 conține: tampon PIPES 90 mmol/l, pH 6; fenol 26mmol/l; colesterol oxidază 200 U/l; colesterol esterază 300 U/l; peroxidază 1250 U/l; 4-amino-antipirină 0,4 mmol/l.

2. Reactiv 4 = **soluție standard de colesterol**, conține colesterol 200 mg/100 ml (5,17 mmol/l).

3. **Material biologic**: ser sau plasmă (sânge recoltat pe heparină).

### Mod de lucru

Se pipetează conform tabelului următor:

Reactivi, $\mu$ l	Probă	Standard	Martor
Reactiv 1	500	500	500
Ser sau plasmă	300	-	-
Standard colesterol	-	300	-
Apă distilată	-	-	300

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

**mg colesterol /100 ml =  $E_{\text{probă}}/E_{\text{standard}}$  x concentrația standard**

Liniaritatea extincție-concentrație se respectă până la un conținut de 800 mg colesterol total/100 ml (21 mmol/l).

### Valori normale:

**140 - 200 mg colesterol / 100 ml ser (<5,68 mmol/l).**

### Semnificație clinică

**Valori crescute:** hiperlipoproteinemie tip IIa, IIb, III, V, diabet zaharat, sindrom nefrotic, alcoolism, hipotiroidism, sarcină, dieta bogată în grăsimi și colesterol, obezitate.

**Valori scăzute:** ciroză hepatică, hipertiroidism, malnutriție, inanție, boli acute.

## 2. Determinarea colesterolului în fracțiunea HDL

### Principiu

În prima etapă fracțiunile LDL, VLDL și chilomicronii sunt eliminate și transformate în componente nereactive printr-o reacție specifică. În a doua etapă, reacțiile sunt cele de la determinarea enzimatică a colesterolului.

### Reactivi (kit Analyticon)

- Reactiv 1** conține: tampon Good, pH 7,00 - 100 mM; colesterol oxidază > 0,8 KU/l; colesterol esterază > 1,0 KU/l; catalază > 500 KU/l; HDCBS - 0,5 mmol/l.
- Reactiv 2** conține: Peroxidază - 30 KU/l; Aminoantipirină - 4 mmol/l.

3. **Reactiv 4 = soluție standard HDL colesterol:** conține HDL colesterol 54,2 mg/dl (1,40 mmol/l).
4. **Material biologic:** ser sau plasmă (sânge recoltat pe heparină). EDTA determină scăderea rezultatului.

### Mod de lucru

Se pipetează conform tabelului următor:

Reactivi, $\mu$ l	Probă	Standard	Martor
Reactiv R1	300	300	300
Ser sau plasmă	300	-	-
Standard colesterol	-	300	-
Apă distilată	-	-	300
<b>Se amestecă bine și se incubează 5 minute la 37°C. Se adaugă:</b>			
Reactiv R2	100	100	100

Se incubează la 37°C. Se citește absorbția inițială la 600 nm după exact 30 secunde ( $E_1$ ). După exact 5 minute se citește absorbția  $E_2$  pentru probă și standard. Se calculează:  $\Delta E = E_2 - E_1$ .

### Calcul

**mg HDL colesterol / 100 ml =  $\Delta E_{\text{probă}} / \Delta E_{\text{standard}}$  x concentrația standard**

### Valori normale

**Bărbați: 35 - 55 mg HDL colesterol/100 ml ser (0,91 - 1,43 mmol/l)**

**Femei: 45 - 65 mg HDL colesterol/100 ml ser (1,17 - 1,69 mmol/l).**

Risc aterogen	Bărbați	Femei
Fără risc	> 55 mg/100 ml	> 65 mg/100 ml
Risc moderat	35 - 55 mg/100 ml	45 - 65 mg/100 ml
Risc crescut	< 35 mg/100 ml	< 45 mg/100 ml

Se mai poate aprecia **riscul aterogen** și prin calcularea **raportului  $C_T/C_{HDL}$** .

raportul  **$C_T/C_{HDL} = 3,5 - 5$  - normal**

**$C_T/C_{HDL} < 3,5$  - risc aterogen scăzut**

**$C_T/C_{HDL} > 5$  - risc aterogen crescut.**

### 3. Determinarea colesterolului din fracțiunea LDL

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.

### Calcul formula Friedewald:

**LDL-colesterol = colesterol total – (HDL-colesterol) – (trigliceride/5)**

unde valoarea trigliceride/5 reprezintă valoarea **VLDL-colesterolului seric**.

Formula nu se aplică în cazul trigliceridelor > 400mg/dl, când se recomandă determinarea LDL-colesterolului prin metode enzimactice sau dozarea apoproteinelor A și B pentru aprecierea riscului de boli cardiovasculare.

#### **Valori normale**

Valorile folosite ca și criteriu de tratament:

- **< 130 mg colesterol LDL/100 ml (<3,38 mmol/l): nu necesită tratament;**
- **130 - 190 mg colesterol LDL/100 ml (3,38-4,92 mmol/l): risc aterogen mediu;**
- **> 190 mg colesterol LDL/100 ml (>4,92 mmol/l): risc aterogen crescut, necesită tratament.**