

**Cadre de predare:** Anghel Andrei: [biochim@umft.ro](mailto:biochim@umft.ro) Grecu Daniela: [grecu.daniela@umft.ro](mailto:grecu.daniela@umft.ro)  
Sfrijan Felicia: [sfrijan.felicia@umft.ro](mailto:sfrijan.felicia@umft.ro) Samoila Corina: [corisamoila@umft.ro](mailto:corisamoila@umft.ro)  
Gurban Camelia: [gurban.camelia@umft.ro](mailto:gurban.camelia@umft.ro) Buzatu Ramona: [buzatu.ramona@umft.ro](mailto:buzatu.ramona@umft.ro)  
Bonte Diana: [bonte.diana@umft.ro](mailto:bonte.diana@umft.ro) Tamas Liviu: [tamas.liviu@umft.ro](mailto:tamas.liviu@umft.ro)  
Mihala Adrian: [mihala.adrian@umft.ro](mailto:mihala.adrian@umft.ro) Bujor Geta: [bujor.cristiana@umft.ro](mailto:bujor.cristiana@umft.ro)  
Alexa Anda: [alexa.anda@umft.ro](mailto:alexa.anda@umft.ro) Marcu Anca: [marcu.anca@umft.ro](mailto:marcu.anca@umft.ro)  
Moatar Alexandra: [moatar.alexandra@umft.ro](mailto:moatar.alexandra@umft.ro) Chis Aimee: [chis.aimee@umft.ro](mailto:chis.aimee@umft.ro)  
Toate întrebările vor fi adresate cadrului de predare corespunzător fiecărei grupe la adresa de email furnizată.

## METABOLISMUL LIPIDIC

### DETERMINAREA ACIZILOR GRAȘI LIBERI ÎN SER

#### Introducere

Acizii grași mobilizați din rezervele țesutului adipos (**AGL**)(sub acțiunea triacilglicerol lipazei hormonodependente) sunt transportați de albuminele serice către țesuturile consumatoare (mușchi, ficat). Legarea pe albumine are o deosebită importanță deoarece **acizii grași liberi** nefixați pe albumine sunt tensioactivi și produc o agregare a plăcuțelor sangvine cu efecte nocive pentru organism.

Nivelul plasmatic al acizilor grași liberi este scăzut, 12 – 16 mg/100 ml, iar viteza de epurare este foarte mare. În fiecare minut circa o treime din acizii grași liberi circulanți părăsesc sângele, fiind preluați de țesuturi. Se explică astfel cum în foame, sângele poate transporta, sub formă de acizi grași liberi, o cantitate de aproximativ 500 grame de grăsime în 24 de ore, din țesutul adipos către țesuturile consumatoare. În calitate de consumatori de acizi grași liberi funcționează în principal țesutul muscular și miocardul.

S-a stabilit că aproximativ o treime din acizii grași liberi ajung la mușchi și o altă treime la ficat. În ficat, o bună parte din acizii grași sunt transformați în triacilgliceroli, iar atunci când afluxul de acizi grași liberi este mult crescut se ajunge la sinteză de corpi cetonici. Resinteza de triacilgliceroli în ficat pe seama acizilor grași mobilizați din depozite reprezintă principalul mecanism prin care organismul previne creșterea excesivă de acizi grași liberi în plasmă ca și cetogeneza. Triacilglicerolii resintetizați în ficat sunt înglobați în lipoproteine cu densitate foarte mică (VLDL, prebetalipoproteine), și secretate în plasmă fiind retrimise către țesuturile extrahepatice.

Pentru determinarea concentrațiilor de acizi grași liberi din ser există metode volumetrice, cromatografice, radiochimice și spectrofotometrice.

#### Partea experimentală

##### Metoda 1

##### Principiu

Acizii grași liberi extrași din ser selectiv cu cloroform formează cu ionii cuprici săruri de cupru solubile în cloroform și insolubile în apă. Ionii de cupru din aceste săruri în prezența dietilditiocarbamatului de sodiu conduc la un compus colorat în galben a cărui absorbție de lumină, măsurată la 440 nm, crește direct proporțional cu nivelul seric al acizilor grași.

##### Reactivi

1. Cloroform p.a.
2. Soluție tampon fosfat cu pH = 6,20 (10,3 grame  $\text{NaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  se dizolvă în aproximativ 70 ml apă, se aduce la pH = 6,20 cu ajutorul unei soluții de

hidroxid de sodiu 5 N, volumul urmând să se completeze cu apă până la 100 mililitri). Soluția se păstrează la +4°C.

3. Reactivul cupric.

Este format din două soluții **a** și **b** care se amestecă înainte de folosire în proporție de 1 : 1, în cantitatea dorită.

a. soluție molară de trietanolamină

b.  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  – 6,45 grame azotat cupric se dizolvă în apă și se completează la un volum final de 100 mililitri. Dacă rămâne un reziduu se filtrează prin hârtie de filtru cantitativă.

4. Dietilditiocarbamat de sodiu – 0,10 grame dietilditiocarbamat de sodiu se dizolvă în 100 mililitri n-butanol, dublu distilat și se păstrează în frigider maximum o săptămână.

5. Soluție etalon de acid stearic 0,05 M – 1,4200 grame de acid stearic se dizolvă într-un balon cotat de 100 mililitri în cloroform. Pentru curba de etalonare se face o diluție 1/100 în cloroform. Cantitatea de acid stearic este de 142 miligrame/litru. Se păstrează în frigider în sticlă brună.

**Stabilirea curbei de etalonare**

Este necesar să se facă la fiecare serie de determinări. Ea se realizează în șase eprubete de centrifugă uscate în care se măsoară conform tabelului de mai jos:

Reactiv		Eprubeta					
		1	2	3	4	5	M
Soluție etalon 142 mg/l în probă	ml	0,20	0,40	0,60	0,80	1,00	-
	mg	5,68	11,36	17,04	22,72	28,40	-
Cloroform	ml	4,80	4,60	4,40	4,20	4,00	5,00
Soluție tampon pH = 6,20	ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Se agită două minute prin vortijare. Se centrifughează 10 minute la 3000 rpm, se îndepărtează stratul superior apos prin absorbție la o trompă de apă. Peste amestecul rămas în eprubete se pipetează:							
Reactiv cupric	ml	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
Se agită două minute prin vortijare, se centrifughează 10 minute la 3000 rpm, se absoarbe stratul apos, se filtrează conținutul eprubetele pe o hârtie cantitativă pentru a îndepărta urmele de apă. Din filtrat se pipetează în alte eprubete de format 160/16.							
Filtrat	ml	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Dietiltiocarbamat de sodiu	ml	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50

Se agită. Imediat va apare o culoare galbenă care după 20 de minute se stabilizează și se poate măsura absorbția ei de lumină față de proba martor, la 440 nm. Culoarea este stabilă timp de 24 de ore.

Din rezultatele obținute se calculează factorul de pantă care servește la stabilirea concentrațiilor în acizi grași liberi pentru probele de analizat.

**Stabilirea concentrației acizilor grași liberi din ser**

Într-o eprubetă de centrifugă se pipetează 5,00 mililitri de cloroform, 2,00 mililitri soluție tampon, 0,50 mililitri ser nehemolizat. Amestecul se agită două minute, se centrifughează 10 minute la 3000 rpm, stratul apos se îndepărtează prin aspirare cu ajutorul unei trompe de vid. Peste extractul cloroformic se pipetează 2,50 mililitri reactiv cupric, se agită două minute, se centrifughează 10 minute la 3000 rpm, se îndepărtează stratul apos prin aspirare cu trompa de vid. Se filtrează și apoi se pipetează într-o eprubetă 2,00 mililitri filtrat, 0,50 mililitri dietilditiocarbamat de sodiu,

se agită. Imediat apare o culoare galbenă a cărei absorbție de lumină se poate măsura după 20 de minute, la 440 nm. Măsurătoarea se face față de martor care constituie o probă tratată identic, care în loc de ser, conține 0,50 mililitri apă.

### Calcul

$$\text{mg AGL/100 ml ser} = E_p \times F$$

( $E_p$  = extincția probei,  $F$  = factorul de pantă)

**Valori normale** (cu această metodă)

0,25 – 0,75 mvali/litru

6,4 – 19,2 mg/100 ml ser

### Metoda 2

#### Principiu

Acizii grași liberi din ser extrași selectiv, formează cu ionii de cobalt săruri solubile în amestecul de extracție. Ionii de cobalt din aceste săruri în prezența  $\alpha$  - nitrozo -  $\beta$  - naftolului conduc la un compus colorat a cărui absorbție de lumină măsurată la 500 nm crește direct proporțional cu conținutul în acizi grași liberi ai probelor de analizat.

#### Reactivi

1. Amestec Dole: 40 ml alcool izopropilic + 10 ml n-heptan + 1 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1N
2. n-heptan
3. Amestec cloroform– heptan (5 :1)
4. Reactiv cobaltic
  - **Soluția A:** 6 grame azotat de cobalt,  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  + 0,80 ml acid acetic glacial se aduc la un volum de 100 ml cu o soluție saturată de sulfat de potasiu ( $\text{K}_2\text{SO}_4$ ). (Soluția saturată de sulfat de potasiu se obține la fierbere și apoi se păstrează la  $37^\circ\text{C}$  în prezența unor cristale în exces)
  - **Soluția B:** este o soluție saturată de sulfat de sodiu ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) obținută la fierbere și păstrată în prezență de exces de cristale la  $37^\circ\text{C}$ .
  - **Prepararea reactivului cobaltic:** 1,35 ml trietanolamină se aduce la 10 ml cu **soluție A**. Se adaugă apoi 7 ml **soluție B** și se agită. Reactivul astfel obținut nu este stabil și trebuie preparat proaspăt pentru fiecare serie de determinări.
5. Reactiv pentru cobalt: soluție de  $\alpha$  - nitrozo -  $\beta$  - naftol 0,40% în alcool 96%. Înainte de utilizare se diluează o parte din această soluție cu 11,5 părți alcool 96%.
6. Acid palmitic p.a.

#### Mod de lucru

0,20 ml ser se agită 10 secunde cu 1,00 ml amestec Dole într-o eprubetă de 10 ml cu dop rotat. Se adaugă 1,20 ml heptan și 2,00 ml apă distilată, agitându-se din nou timp de 3 minute. După separarea spontană a celor două faze se iau 1,20 ml din faza superioară heptanică și se trec în altă eprubetă de 10 ml cu dop rotat. Se adaugă 1,80 ml cloroform-heptan și 2,00 ml reactiv cobaltic proaspăt preparat. Se agită bine timp de 5 minute și apoi amestecul se centrifughează timp de 15 minute la 2500 rpm. În eprubete de format 120/12 se ia apoi 1,00 ml din stratul superior și se amestecă cu 1,50 ml soluție de  $\alpha$  - nitrozo -  $\beta$  - naftol. Culoarea portocalie care se dezvoltă este stabilă timp de câteva ore. Se măsoară absorbția de lumină a probelor față de martor (martorul se obține respectând protocolul descris cu o singură excepție prin care în loc de 0,20 ml ser se folosesc 0,20 ml apă distilată) la 500 nm.

### **Prepararea standardului**

Se dizolvă 12,8 mg acid palmitic p.a. ( $M = 256$ ) în 25 ml hexan și se obține o soluție cu concentrația 2  $\mu\text{Eq/ml}$ . Apoi se amestecă un volum din această soluție cu 3 volume hexan și se ajunge la o concentrație de 0,5  $\mu\text{Eq/ml}$ . Se iau din această soluție volumele de 0,10 ml, 0,20 ml și 0,40 ml și se introduc în 3 eprubete unde se evaporă la sec. Se adaugă câte 0,20 ml ser fiziologic în fiecare eprubetă astfel încât concentrația de acizi grași liberi în cele trei probe standard ajunge la 0,25  $\mu\text{Eq/ml}$ , 0,50  $\mu\text{Eq/ml}$  respectiv 1,00  $\mu\text{Eq/ml}$ . Apoi se procedează ca și în cazul probelor de ser de analizat. Valorile AGL se stabilesc din curba obținută cu ajutorul diluțiilor din soluția standard și se exprimă în  $\mu\text{Eq/ml}$  sau  $\text{mEq/l}$ .

**Valorile normale** (determinate cu această metodă)

0,40 – 0,60  $\text{mEq/litru}$

14 – 16  $\text{mg/100 ml ser}$

### **Variații fiziologice**

Conținutul de acizi grași liberi din ser este mai mare la copii în perioada prepubertară, crește la femei în ultimul trimestru al sarcinii și revine la normal imediat după naștere.

Frigul, nicotina, alcoolul, stările de stres și foamea cresc concentrația sanguină de acizi grași liberi.

### **Variații patologice**

Valori crescute se întâlnesc în:

- diabet zaharat
- hipertiroidie
- feocromocitom
- obezitate
- boala Refsum
- glicogenoze

## **DETERMINAREA TRIACILGLICEROLILOR SERICI**

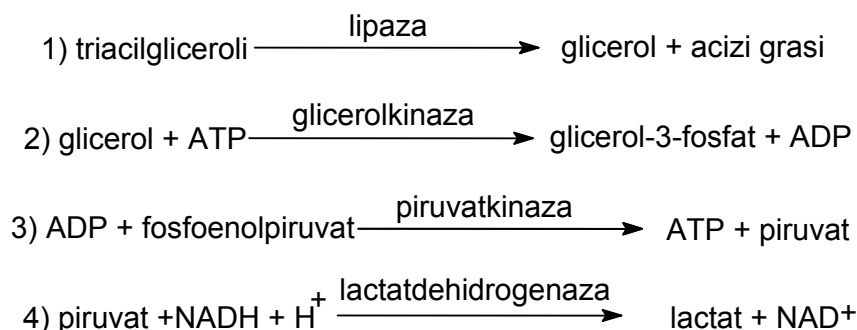
### **Introducere**

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 enzimatic.

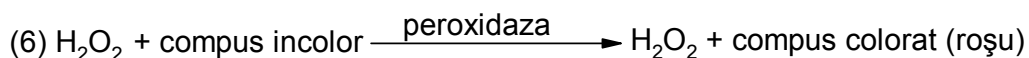
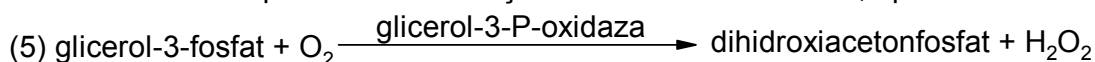
Tehnicile enzimatic folosite actual au la bază o secvență de reacții enzimatic redate în continuare, în fiecare situație existând o enzimă caracteristică metodei respective. Pentru tehnica care folosește piruvatkinaza, cu măsurare finală în ultraviolet, secvența de reacții este:



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:

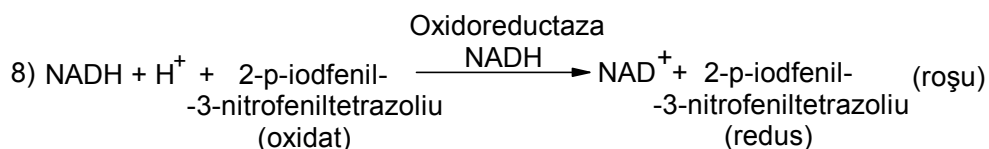
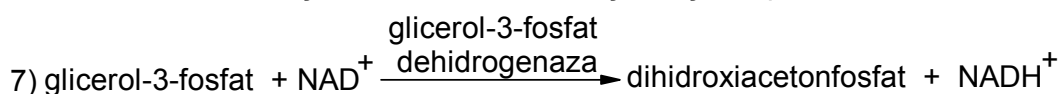
Se realizează primele două reacții ca în tehnica de mai sus, apoi urmează:



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:



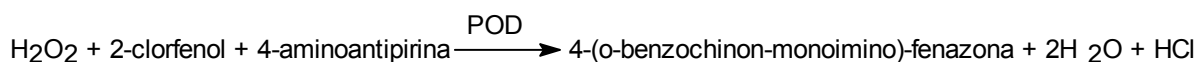
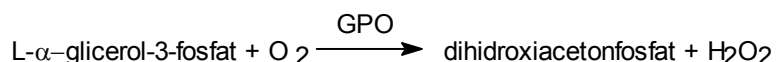
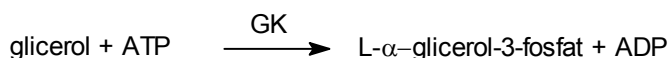
Producția de compus colorat este direct proporțională cu nivelul triacilglicerolemiei.

## 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 ( $\mu$ l )	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

$$\text{mg\% triacilgliceroli} = \frac{E_p}{E_s} \times 200$$

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 corpii 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 (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.

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 etapă, 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, sinteză 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 corpurilor cetonice în urină**

#### **Principiu**

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

#### **Reactivi și materiale:**

1. Urină 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 indică prezența corpurilor cetonice.