

**FACULTATEA DE MEDICINĂ
NUTRIȚIE ȘI DIETETICĂ ANUL I
ȘEF LUCRĂRI DR. FELICIA SFRIJAN**
sfrijan.felicia@umft.ro

**BIOCHIMIE
LUCRAREA PRACTICĂ NR. 5**

EXPLORAREA METABOLISMULUI LIPIDIC

1. DETERMINAREA TRIACILGLICEROLILOR SERICI/ PLASMATICI

Introducere

În practica medicală triacilglicerolii serici/plasmatici sunt cunoscuți sub denumirea de **trigliceride serice/plasmatice**.

Determinarea trigliceridelor serice/plasmatică se folosește pentru:

- evaluarea și diagnosticul diferențial al hiperlipidemiilor primare sau secundare;
- evaluarea factorilor de risc ai pancreatitei acute;
- calcularea colesterolului din fracțiunea LDL cu ajutorul formulei lui Friedewald.

Metodele folosite actual în laboratoarele clinice, pentru determinarea concentrației trigliceridelor serice/plasmatică au la bază determinarea glicerolului din triacilgliceroli prin tehnici enzimatică.

Aplicație practică

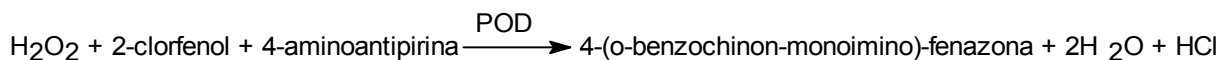
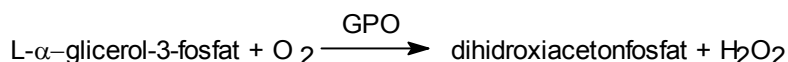
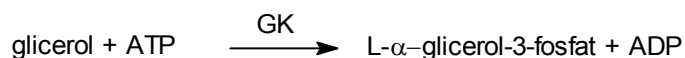
Determinarea trigliceridelor serice/plasmatică prin metoda enzimatică

Pregătirea pacientului:

- să respecte o dietă neschimbată timp de 3 săptămâni înainte de recoltare;
- să aibă o greutate corporală stabilă;
- să nu mănânce 12 ore înainte de recoltare (poate să bea apă);
- să nu consume alcool timp de 72 ore înainte de recoltare.

Principiu

Triacilglicerolii sunt hidrolizați enzimatic la glicerol și acizi grași liberi de către lipaze specifice. Glicerolul reacționează apoi conform reacțiilor, rezultând în final un compus colorat fotometric:



unde: GK – glicerolkinaza; GPO – glicerolfosfatoxidaza; POD – peroxidaza

Reactivi

1. Reactiv 1: conține Tampon PIPES (50 mM/l, pH = 7,8), p-clorofenol (2mM/l), lipoproteinlipaza (150 000 U/l), glicerol kinaza (800 U/l), glicerolfosfat oxidaza (4000 U/l), peroxidaza (440 U/l), 4-aminoantipirina (0,7 mmol/l), ATP (0,3 mmol/l).
2. Soluție standard de trigliceride: conține glicerol, echivalent cu 200 mg/dL (2,3 mmol/l) trigliceride.
3. Material biologic: ser sau plasmă (sânge recoltat pe heparină sau EDTA).

Mod de lucru

Se pipetează în trei eprubete conform tabelului:

Reactivi (μl)	Probă	Standard	Martor
Reactiv 1	1000	1000	1000
Soluție standard (200 mg/dl)	-	100	-
Ser/plasmă	100	-	-
Apă distilată	-	-	100

Se agită, se incubează 5 minute la 37°C sau 10 min la temperatura camerei. Se măsoară absorbanta probei (A_P) și a standardului (A_S) față de martor, la lungimea de undă de 546 nm, în interval de 60 de minute.

Calcul:

$$\text{mg trigliceride /dl} = A_P/A_S \times \text{concentrația standard}$$

Liniaritatea extincție-concentrație se respectă pentru concentrații de până la 800 mg trigliceride/dl. Pentru concentrații mai mari serul se diluează corespunzător cu apă distilată.

Valori normale:

- < 200 mg/dl (2,3 mmol/l);
- valorile de > 200 mg/dl (> 2,3mmol/l) indică hipertrigliceridemie;
- < 160 mg/dl (< 1,8 mmol/l) → fără risc de ateroscleroză;
- 160-200 mg/dl (1,8-2,3 mmol/l) → risc discutabil;
- > 200 mg/dl (> 2,3 mmol/l) → risc crescut de ateroscleroză

Factor de conversie: $\text{mg/dl} \times 0,0114 = \text{mmol/l}$.

Semnificație clinică

Concentrația trigliceridelor serice/plasmatice este într-o mare măsură dependentă de obiceiurile alimentare. Creșteri tranzitorii pot apărea după un prânz bogat și după consumul de alcool.

Valori crescute pot fi întâlnite în: sarcină, obezitate, lipsa activității fizice, fumat, unele medicamente (ex: corticosteroizi, estrogeni).

Valori scăzute pot fi determinate de efortul fizic intens (scădere tranzitorie), modificarea dietei (în interval de 3 săptămâni), pierderea ponderală (scădere permanentă), unele medicamente (ex: acid ascorbic în doze mari, acid aminosalicilic, acizi grași omega-3).

Valori crescute patologice: hiperlipoproteinemii primare Fredrickson (cu excepția tipului IIa), infarct miocardic, diabet zaharat, hipotiroidie, boli hepatice, icter obstructiv, sindrom nefrotic. Valorile $> 1000 \text{ mg/dl}$ pot provoca pancreatită acută. Valorile $> 500 \text{ mg/dl}$ în prezența pancreatitei diagnosticate reprezintă **valori de alertă clinică**.

Valori scăzute patologice: boli consumptive, marasm, inanție, hipertiroidism, arsuri, enteropatie exudativă.

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

Lipoproteinele plasmaticе sunt forme de transport a lipidelor din sânge. Ele transportă lipidele insolubile în apă între diferite organe pe cale sanguină. Sunt structuri lipo-lipido-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 plasmaticе se împart în:

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 $1,063 \text{ g/cm}^3$ (densitate ce corespunde unei lipoproteine cu conținut egal de lipide și proteine) au fost separate 4 fracțiuni:

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

2. Electroforeza-lipoproteinele plasmaticе 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;

- β -lipoproteine-corespund LDL;
- pre- β -lipoproteine-corespund VLDL;
- α -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- β) apare doar în urme.

2.1. DETERMINAREA COLESTEROLULUI TOTAL SERIC/ PLASMATIC

Introducere

Determinarea colesterolului total seric/plasmatic este recomandată pentru:

- monitorizarea factorilor de risc crescut pentru boala coronariană;
- screening-ul dislipidemiilor primare și secundare;
- controlul terapiei hipolipemiente (alimentar, medicamentos).

Metodele folosite actual în laboratoarele clinice, pentru determinarea concentrației colesterolului total seric/plasmatic sunt bazate pe tehnici enzimatice.

Aplicație practică

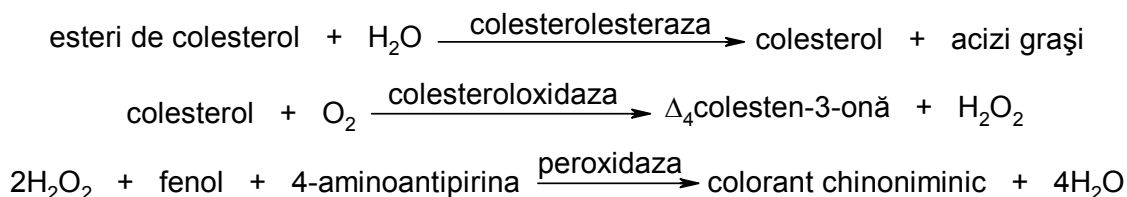
Determinarea colesterolului total (C_T) seric/plasmatic prin metoda enzimatică

Pregătirea pacientului:

- să respecte o dietă neschimbată timp de 3 săptămâni înainte de recoltare;
- să aibă o greutate corporală stabilă;
- să nu mănânce 12 ore înainte de recoltare (poate să bea apa);
- să nu consume alcool timp de 72 ore înainte de recoltare;
- staza venoasă prelungită (produsă de garou) și recoltarea sângelui cu pacientul în ortostatism cresc valoarea colesterolemiei cu până la 10%.

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. Soluție standard de colesterol, conține colesterol 200 mg/dl (5,17 mmol/l).
3. Material biologic: ser sau plasmă (sânge recoltat pe heparină). Anticoagulanții cum sunt fluorura, citratul sau oxalatul cauzează erori, datorită diluției realizate ca urmare a efluxului apei din eritrocite în plasmă.

Mod de lucru

Se pipetează în trei eprubete conform tabelului:

Reactivi (μl)	Probă	Standard	Martor
Reactiv 1	1000	1000	1000
Ser/plasmă	100	-	-
Standard colesterol (200 mg/dl)	-	100	-
Apă distilată	-	-	100

Se agită, se incubează 5 minute la 37°C sau 10 minute la temperatura camerei. Se măsoară absorbanta probei (A_P) și a standardului (A_S) față de martor, la lungimea de undă de 546 nm, în interval de 60 de minute.

Calcul:

$$\text{mg colesterol /dl} = A_P/A_S \times \text{concentrația standard}$$

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

Valori normale:

- < 200 mg/dl (< 5,17 mmol/l);
- Valorile > 260 mg/dl reprezintă risc semnificativ crescut de boală aterosclerotică. Evidențierea unor valori crescute ale colesterolului total seric/plasmatic trebuie urmată de determinarea diferențiată a fracțiunilor de colesterol.

Factor de conversie: mg/dl x 0,026 = mmol/l.

Semnificație clinică

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

Valori scăzute: ciroză hepatică, hipertiroidism, malnutriție, inaniție, boli acute, unele medicamente (ex: derivati de ac. fibric -clofibrat, gemfibrozil; inhibitori de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductazei – lovastatin, pravastatin, simvastatin)

2.2 DETERMINAREA COLESTEROLULUI DIN FRAȚIUNEA HDL

Introducere

HDL-colesterolului (HDL-C) și apolipoproteinei-A li se atribuie un efect de protecție antiaterogen. Pacienții cu concentrații serice ridicate ale HDL-C au un risc scăzut de a face ateroscleroză.

Determinarea HDL-C seric/plasmatic este recomandată pentru:

- evaluarea riscului de boală coronariană;
- diagnosticul hiperlipoproteinemiei.

Există variate metode de determinare a HDL-C: ultracentrifugarea, electroforeza, HPLC și metode bazate pe precipitare. Metodele enzimaticе bazate pe precipitare sunt utilizate uzual în laboratorul clinic.

Valori normale

Bărbați: 35 - 55 mg/dl (0,90 - 1,45 mmol/l)

Femei: 45 - 65 mg/dl (1,15 - 1,68 mmol/l).

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

Se poate aprecia **riscul aterogen** și prin calcularea **raportului $C_T/HDL-C$** .

raportul $C_T/HDL-C = 3,5 - 5$ - normal

$C_T/HDL-C < 3,5$ - risc aterogen scăzut

$C_T/HDL-C > 5$ - risc aterogen crescut.

Factor de conversie: mg/dl x 0,026 = mmol/l.

2.3. DETERMINAREA COLESTEROLULUI DIN FRAȚIUNEA LDL

Introducere

Determinarea LDL-colesterolului (LDL-C) seric/plasmatic este recomandată pentru:

- estimarea riscului cardiovascular și
- stabilirea deciziei terapeutice.

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

Calcul formula Friedewald:

$$LDL-C = C_T - (HDL-C) - (trigliceride/5)$$

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 enzimaticе sau dozarea apoproteinelor A și B pentru aprecierea riscului de boli cardiovasculare.

Valori normale

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

Se poate aprecia **riscul aterogen** și prin calcularea **raportului $LDL-C/HDL-C$** .

raportul $LDL-C/HDL-C = 2,9-3,3$ normal

LDL-C/HDL-C > 3,5 - risc aterogen crescut la femei

LDL-C/HDL-C > 3,8 - risc aterogen crescut la bărbați

Factor de conversie: mg/dl x 0,026 = mmol/l.