

Medicină Dentară
Anul I
Grupele 1-10
As.univ.Dr. Buzatu Alina Ramona
buzatu.ramona@umft.ro

Pentru materialul de laborator, corespondenta se realizeaza cu titularul de laborator, la adresa de corespondenta de mai sus.

Laboratorul 6

METABOLISMUL LIPIDIC. **LIPOPROTEINELE PLASMATICE. DETERMINAREA COLESTEROLULUI TOTAL** **ȘI A COLESTEROLULUI HDL ÎN SÂNGE.**

I. Lipoproteinele plasmaticice

Lipoproteinele plasmaticice asigură transportul diferitelor clase de lipide între principalele organe implicate în metabolismul lipidelor și restul țesuturilor. Din punct de vedere structural, o lipoproteină are un miez lipidic format din triacilgliceroli și colesterol esterificat, înconjurat de un monostrat de fosfolipide și colesterol liber, care au grupările polare orientate către mediul apos exterior. În înveliș sunt componentele proteice numite apolipoproteine.

Apoproteinele îndeplinesc mai multe roluri ca solubilizarea, transportul fracțiilor lipidice, markeri pentru receptorii celulari specifici, cofactori enzimatici.

Fracțiile lipoproteice sunt:

Chilomicronii sunt formați din lipidele exogene în enterocite, iar funcția lor principală este de a transporta triacilglicerolii exogeni la țesutul adipos și mușchi și colesterolul și fosfolipidele exogene la ficat.

VLDL sunt formate în ficat, iar rolul principal al VLDL este de a transporta trigliceridele endogene către țesuturi.

LDL se formează în ficat din VLDL rezidual (IDL). Rolul principal al LDL este de a transporta colesterolul de la ficat la țesuturile endogene.

HDL sunt formate în ficat și intestin. Rolul HDL este de a prelua excesul de colesterol din diferite țesuturi și de al transporta la ficat pentru eliminare, transformarea în acizi biliari sau recircularea acestuia.

Metodele de separare a lipoproteinelor plasmaticice:

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 $1,063 \text{ g/cm}^3$ (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 (Very Low Density Lipoproteins) $d = 0,96-1,006 \text{ g/cm}^3$;

- LDL (Low Density Lipoproteins) $d = 1,006-1,063 \text{ g/cm}^3$;
- HDL (High Density Lipoproteins) $d = 1,063-1,21 \text{ g/cm}^3$.

2. **Electroforeza**-lipoproteinele plasmatice 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. Frațiunile 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.

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.

II. Colesterolul

Colesterolul, $C_{27}H_{45}-OH$, este o moleculă lipidică de o importanță deosebită în corpul uman. Este o componentă esențială a membranelor celulare, a lipoproteinelor plasmatice, precursorul hormonilor steroanici, acizilor biliari și a vitaminei D_3 . Corpul uman conține aproximativ 140 de grame de colesterol, majoritatea sub formă liberă (neesterificată), localizat în membranele celulare, în special în țesutul nervos. Forma esterificată se găsește în cortexul suprarenal și în lipoproteinele plasmatice. Colesterolul provine din alimente (aproximativ $\frac{1}{2}$) și din sinteza endogenă (în ficat și intestin). Din colesterolul sintetizat în ficat, majoritatea este exportat sub trei forme: colesterolul biliar, acizii biliari și colesterolul care circulă în lipoproteine. Colesterolul din dietă provine din alimente bogate în colesterol, precum: ou, ficat, creier; colesterolul alimentar zilnic total care ajunge în intestin este de aproximativ 1 gram. Colesterolul din dietă, mai ales ca formă esterificată, este hidrolizat de colesterol esteraza pancreatică, apoi trece în enterocit, unde, sub acțiunea enzimei acil-CoA colesterol acil transferaza (ACAT) este din nou esterificat și încorporat în chilomicroni. După hidroliza trigliceridelor din endoteliu, chilomicronii reziduali, bogați în colesterol, sunt captați de ficat. În ficat, o parte din colesterol, liberă și esterificată, este inclusă în VLDL care transferă lipidele hepatice la restul țesuturilor. După transferul trigliceridelor, VLDL rezidual revine în ficat și este încărcat cu colesterol, transformându-se în fracțiunea LDL, care este principalul distribuitor al colesterolului la țesuturi. Excesul de colesterol din țesuturi este colectat și returnat la ficat de un alt tip de lipoproteină, HDL.

Căile de transformare ale colesterolului:

1. în tegumente colesterol \rightarrow colesterciferol (vitamina D_3)
2. în suprarenale colesterol \rightarrow hormoni corticosteroizi

3. în glandele sexuale colesterol → hormoni sexuali
4. în ficat colesterol → acizi biliari primari
5. în ficat și intestin colesterol → lipoproteine plasmatice

În organismul uman nucleul steranic nu poate fi degradat. Astfel, colesterolul este eliminat din organism:

- pe cale biliară:
 - colesterol biliar → intestin → reducere la coprostanol/ colestanol → fecale
 - Acizi biliari nereabsorbiți → fecale
- Descuamarea celulelor epiteliale intestinale → fecale
- Secreția sebacee
- Eliminarea urinară a metaboliților hormonilor steranici și ai vitaminelor D

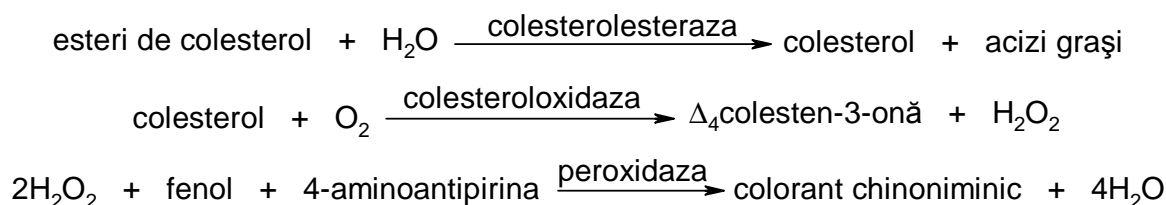
Colesterolul este prezent în toate țesuturile animale, în general sub formă de esteri cu diverși acizi grași.

Determinarea colesterolului total este recomandată pentru:

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

II.1. Determinarea colesterolului total prin metoda enzimatică

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, μl	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

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

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, inaniție, boli acute.

II.2. Determinarea colesterolului în fracțiunea HDL

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)

1. 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.
2. 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, μ l	Probă	Standard	Martor
Reactiv R1	300	300	300
Ser sau plasmă	300	-	-
Standard colesterol	-	300	-
Apă distilată	-	-	300
Se amestecă bine și se incubează 5 minute la 37°C. Se adaugă:			
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.

II. 3. Determinarea colesterolului din fracțiunea LDL

LDL-colesterolul poate fi determinat direct prin metode enzimactice 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.