

**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 5**

### **METABOLISMUL LIPIDIC.** **DETERMINAREA ACIZILOR GRAȘI ȘI A TRIGLICERIDELOR ÎN SÂNGE.** **IDENTIFICAREA CORPILOR CETONICI ÎN URINĂ.**

#### **I. Acizi grași. Trigliceride. Lipoproteine plasmatice**

Aportul zilnic de lipide este de 100-150 de grame, din care 90-95% trigliceride, iar restul de colesterol, fosfolipide și vitamine liposolubile. Cavitatea bucală și stomacul secretă lipaze. Ele hidrolizează triacilglicerolii la diacilgliceroli și acizi grași cu lanț scurt și mediu. Acești acizi cu lanț scurt, relativ hidrofilii, sunt absorbiți prin peretele stomacului ajungând în sânge. Diacilglicerolii și acizii grași cu lanț lung trec în duoden, unde vor fi hidrolizați de lipaze în intestin. În duoden, digestia este rezultatul acțiunii combinate a lipazei pancreatice, a sărurilor biliare și a pH-ului alcalin în intestin. Acilglicerolii formează miceli cu sărurile biliare care au grupările -OH orientate spre exterior și leagă lipaza pancreatică. Acțiunea lipazei va fi sporită prin prezența colipazei pancreatice, proteină care realizează asocierea dintre lipază și miceliul lipidic. Se realizează, în acest mod, atât dispersia picăturilor lipidice, cât și contactul lipid-lipază. Acțiunea de dispersie a picăturilor lipidice este accelerată de sărurile acizilor grași formate din hidroliza lizolecitinei obținute prin hidroliza parțială a lecitinelor.

În timpul digestiei, lipaza pancreatică hidrolizează în mod specific legăturile esterice în pozițiile 1 și 3, rezultă astfel două molecule de acizi grași și 2-monoacilglicerol. Aproximativ 75% din trigliceridele digerate sunt transformate și absorbite sub formă de 2-monoacilgliceroli, în timp ce restul de 25%, deși inițial se transformă în 2-monoacilgliceroli, se izomerizează la 1-monoacilglicerol care, sub acțiunea lipazei, este hidrolizat în glicerol și acid gras.

În acest fel, digestia trigliceridelor produce 2-monoacilglicerol, acizi grași și glicerol.

Acizii grași liberi sunt transportați prin atașarea la albumine serice prin legături non-covalente. Trigliceridele, fosfolipidele și colesterolul formează agregate cu proteine, numite lipoproteine plasmatice.

**Lipoproteinele plasmatice** asigură transportul diferitelor clase de lipide între organele principale implicate în metabolismul lipidelor și restul țesuturilor.

**Acizii grași** sunt constituenți ai tuturor categoriilor de lipide. Sunt, de asemenea, moleculele organice cu cel mai mare potențial energetic, ceea ce explică utilizarea trigliceridelor ca formă de stocare a energiei în țesutul adipos. Oxidarea totală a 1 mol acid palmitic eliberează 2338 kcal, în timp ce oxidarea a 1 mol de glucoză eliberează 686 kcal atunci când se oxidează total.

Catabolismul acizilor grași apare în toate țesuturile, cu excepția creierului și a eritrocitelor (țesuturile dependente de glucoză). Catabolismul are loc intra-mitocondrial în vecinătatea lanțului respirator, ceea ce facilitează transferul de hidrogen, rezultat din dehidrogenarea acizilor grași, direct în lanțul respirator.

Acizii grași, mobilizați din țesutul adipos (sunt numiți acizi grași liberi, nefiind esterificați și eliberați de triacilgliceroli sub acțiunea lipazei) sunt transportați cu albumine serice către țesuturile consumatoare (mușchi, ficat). Legarea la albumine este foarte importantă, deoarece acizii grași liberi sunt tensioactivi și produc efecte nocive pentru organism.

Nivelul plasmatic al acizilor grași liberi este scăzut, **12 - 16 mg / 100 ml**, iar viteza de eliminare a acestora din plasmă este foarte mare. În fiecare minut, aproximativ o treime din acizii grași din sânge sunt preluați de țesuturi. Principalii consumatori de acizi grași sunt mușchii și miocardul.

S-a stabilit că aprox. o treime din acizii grași sunt preluați de mușchi și o altă treime de ficat. În ficat, o mare parte din acizii grași sunt transformați în triacilgliceroli, iar atunci când fluxul de acizi grași este foarte mare, corpii cetonici sunt sintetizați. Resinteza triacilglicerolilor în ficat, cu utilizarea acizilor grași mobilizați din depozite, reprezintă principalul mecanism prin care organismul împiedică creșterea excesivă de acizi grași în plasmă și de asemenea cetogeneza. Trigliceridele resintetizate în ficat sunt incluse în lipoproteinele cu densitate foarte mică (VLDL, prebeta-lipoproteine) și secretate în plasmă, fiind retrimise la țesuturile extra-hepatice.

Pentru a determina concentrația de acizi grași liberi în plasmă, există diferite metode: volumetrică, cromatografică și spectrofotometrică.

#### **Variații fiziologice**

Concentrația de acizi grași liberi în ser este mai mare la copiii în perioada de pre-pubertate, crește în ultimul semestru de sarcină și revine la valoarea normală imediat după naștere. Frigul, nicotina, alcoolul, stările de stres și foamea cresc concentrația acizilor grași liberi în sânge.

#### **Variații patologice**

Valorile crescute se regăsesc în: diabet zaharat, hipertiroidism, feocromocitom, obezitate, boala Refsum, glicogeneză.

**Triacilglicerolii** (TAG) sunt esteri ai glicerolului cu acizii grași. Metabolizarea trigliceridelor are loc mai ales în intestin, în țesuturile hepatice și adipoase. În intestin, TAG sunt încorporate în chilomicroni urmând calea limfatică și apoi sunt trecute în fluxul sanguin. În țesuturi, lipoprotein lipaza acționează asupra lor. Enzima LPL acționează în țesutul adipos, mușchiul scheletic, miocard, plămâni, rinichi, aortă, dar nu și în ficat și creier. Sub acțiunea LPL, 90% din trigliceridele din chylomicroni sunt hidrolizate. După prânz, la un titru mare de TAG în sânge, acestea sunt utilizate de țesutul adipos. În stare de foame, TAG-urile sunt folosite de miocard și mușchii scheletici.

#### **Determinarea trigliceridelor prin metoda enzimatică**

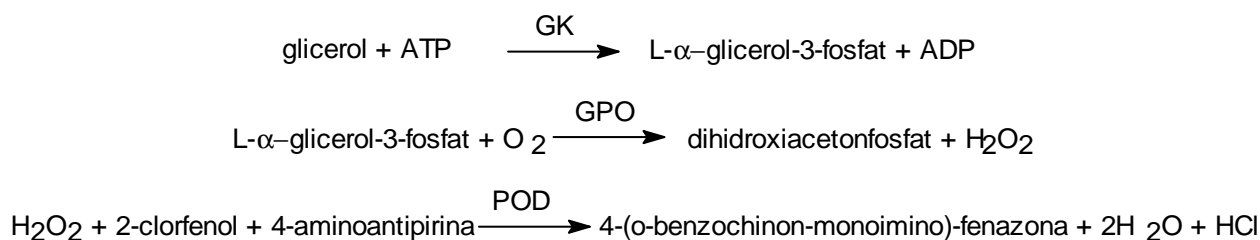
Triacilglicerolii nu dau o reacție specifică de recunoaștere, de aceea nici determinarea lor nu se poate face ca atare, ci fie folosind o cale indirectă de determinare, prin calcul, fie o cale directă în care se determină însă numai o parte componentă a moleculei, prin intermediul căreia se calculează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

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



unde: GK – glicerol kinaza; GPO – glicerolfosfat-oxidaza; POD – peroxidaza

#### **Reactivi**

1. Reactiv 1: Tampon PIPES: conține acid piperazin-N,N'-bis-(2-etansulfonic) - 50 mM, pH = 7,2; p-clorofenol – 2mM
2. Reactiv 2: conține lipoproteinlipaza – 150000 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. Amestec reactiv: se dizolvă conținutul flaconului Reactiv 2 într-un volum corespunzător de Reactiv 1.
3. Soluție standard triacilgliceroli – conține glicerol, echivalent la 200 mg/dL (2,28 mmol/l) triacilgliceroli.
4. Material biologic: ser sau plasmă (sânge recoltat pe heparină)

#### **Mod de lucru**

Se pipetează în trei eprubete conform tabelului:

Reactivi, $\mu\text{l}$	Probă	Standard	Martor
Amestec reactiv	500	500	500
Soluție standard (200 mg/dL)	-	300	-
Ser	300	-	-
Apă distilată	-	-	300

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, în interval de 60 de minute.

**Calcul  $\text{mg triacilgliceroli} / 100\text{ml} = E_P/E_S \times \text{concentrația standard}$**

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:** În practica medicală **triacilgliceroli** sunt cunoscuți sub denumirea de **trigliceride serice (TG):**

**Femei: 40 - 140 mg/100 ml ser (0,45 – 1,58 mmol/l)**

**Bărbați: 60 - 165 mg/100 ml ser (0,67 – 1,86 mmol/l).**

### **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.

## **II. Corpii cetonici**

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, acetonă.

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, miocardul, țesutul renal și țesutul nervos) pot utiliza energogen acetoacetatul și  $\beta$ -hidroxibutiratul. 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 insulină sau aportul de glucoză 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 lipoliză 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 concentrației acizilor grași liberi în sânge. În ficat, aceasta determină, într-o primă etapă, sinteza sporită de triacilgliceroli endogeni (hipertriacilglicerolemie endogenă, triacilglicerolii fiind incluși în VLDL și retrimiși în circulație), iar apoi hiperproducția de corpi cetonici (cetonemie-cetoză) 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 că eliminarea corpurilor cetonice se face sub formă de săruri, ei consumă rezerva alcalină a organismului și apare acidoza.

### **Evidențierea corpurilor cetonice în urină**

Se utilizează metoda Legal-Imbert - corpii cetonici (acidul acetoacetic și acetona; acidul beta-hidroxibutiric nu reacționează) din urină dau cu nitroprusiatul și amoniacul un amestec de culoare violetă.

#### **Reactivi**

1. Urină proaspătă de dimineață.
2. Reactiv Legal-Imbert: 5 g nitroprusiat de sodiu și 50 ml acid acetic glacial se dizolvă și se completează la 100 ml cu apă distilată.
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 prezenta corpurilor cetonice.