

## LIPIDELE PLASMATICE

Jenő Módy

Lipidemia normală este de 500—800 mg %, din care cca 25% (140—160 mg %) sînt grăsimi neutre, o treime este colesterol (160—180 mg %), iar restul de 45% sînt fosfatide (mai ales lecitină, cefalină, mai puțin siingonoleină și acetalfosfatide) și alte lipide (carotine, vitamine liposolubile, hormoni steroizi etc.). Prin faptul că plasma sanguină e limpede și transparentă, cu toate că este relativ bogată în lipide, s-a ajuns la ipoteza că în plasmă lipidele se află într-o stare de dispersie foarte fină. Această dispersie fină nu se poate explica numai prin emulsie, deoarece cele mai multe lipide plasmatică nu se pot extrage cu eter. Eluția lor reușește numai după o denaturare a proteinelor plasmatice (alcool, congelare-topire etc.). Datorită acestui fenomen și altor proprietăți ale lipidelor, s-a tras concluzia probabilă că lipidele sînt legate în plasmă de proteine, formînd complexe hofile, numite lipoproteine (în cele de mai jos LP).

Existența LP-lor a fost pusă în evidență de *Macheboeuf* încă în anul 1929: în ser de cal, prin precipitare fracționată s-au obținut proteine conținînd lipide („cénapses acidoprécipitables“). Mai tîrziu s-a confirmat că această fracțiune, care nu conține colesterol aparține în majoritatea sa alfa-globulinelor. Odată cu perfecționarea metodelor de fracționare fizico-chimice s-a putut face o examinare mai aprofundată a LP-lor. În anul 1941 s-a dovedit că lipidele nu se împart proporțional între fracțiunile proteice, ci sînt legate mai ales de globulinele alfa și beta. (*Blix, Tiselius, Svensson*). S-a constatat însă că metoda *Tiselius* nu e potrivită pentru analiza cantitativă a LP-lor. Mult mai convenabile s-au adevărit a fi ultracentrifugarea, precipitarea salină a lui *Cohn*, precum și mai recent electroforeza pe hîrtie. *Pedersen* în 1945 a găsit în plasmă o fracțiune proteică, așa numită „component X“, care e extrem de bogată în lipide. Această fracțiune migrează la electroforeză împreună cu beta globulinele, și flocează după *Cohn* cu grupa III-0. Totodată *Pedersen* a observat că sedimentarea redusă a LP-lor nu e cauzată de mica lor greutate moleculară (avînd dimensiuni în jurul  $10^6$ ), ci de densitatea lor redusă ( $d < 1,03$ ). *Gofman* și colaboratorii au introdus examinarea flotajei LP-lor. Într-un mediu cu densitate mai mare decît a lor ( $d = 1,065$ ): LP-le

migrează contrar forței de gravitație, această migrație fiind denumită fenomenul flotației. Gradul flotației se poate măsura în „unități de sedimentare-flotare”, avind simbolul Sf care înseamnă o deplasare de  $10^{-13}$  cm/sec într-un câmp de forță egal cu unitatea. Ținând seama de flotația lor, *Gajman* împarte LP-le plasmiei în două grupe bine delimitate: el diferențiază grupele LP-lor de densitate redusă (LPDR/d = 1—1,05) și de densitate mare (LPDM/d = peste 1,04). Valorile lor Sf: 1—12, 12—20, 20—100 și 100—400. Greutatea lor moleculară este de 165.000, adică 1,7—4,4 și 5,9 milioane. *Jahnke* deosebește 7 fracțiuni LP-ce în plasmă, marcându-le L<sub>1</sub>—L<sub>7</sub>. În plasma normală se găsește numai două, sau cel mult trei fracțiuni, dominând fracțiunea L<sub>1</sub> (cca. 400 mg %).

Pentru studierea LP-lor s-a dovedit indicată și precipitarea salină (*Cohn* și colab.). Prin examinarea ulterioară a fracțiunii III-d care este alcătuită mai mult din alfa-și betaglobuline s-a dovedit că această fracțiune conține și o cantitate remarcabilă de lipide. Aceste complexe lipoproteice au fost izolate, și într-o stare mai pură, compoziția lor este destul de bine cunoscută.

Metoda cea mai potrivită și accesibilă e aceea a electroforezei pe hirtie. Colorația lipoidică a fracțiilorlor separate pe hirtie de filtru prin electroforeză a fost aplicată prima dată de *Swahn*, în 1952. În același timp au apărut în literatură și alte metode similare (folosind Ötrot, Sudan-III, Ciba-blau, Sudan-schwarz). De obicei pe banda de hirtie electroforetică apar două fracțiuni LP: alfa-1 și beta-LP. Cantitatea lor relativă este de 35—45, respectiv 55—65%. În unele cazuri apare și alfa-2-LP, precum și „lipidele punctului de start”, care rămân la locul aplicării serului analizat. Denumirea de „gama-LP” pentru acestea din urmă nu este corectă, deoarece se poate demonstra că, într-un mediu cu pH corespunzător, gama-globulinele migrează catodic, lipidele punctului de start rămân pe loc, iar fracțiunea gama deplasată apare fără lipide. Lipidele punctului de start sînt lipide libere, emulsionate nelegate de proteine, și se numesc chilomicroni. În teritoriul util de pH (8—9), ele nu migrează în câmp electric.

Fracționarea LP-lor e defavorabil influențată într-o oarecare măsură de adsorbția lor pe hirtie de filtru. Acest fenomen se poate evita prin electroforeză în mediu de amidon, sau pe hirtie de filtru îmbibată cu o soluție de amidon (*Ackermann, Carlsson*, 1954). LP-le arată o altă mobilitate și la electroforeză pe gel de agar: grupa lor lentă migrează cu alfa-1, grupa de mobilitate medie cu albuminele „hipalbumina”, iar o parte a lor depășește această fracțiune („fracțiunea rapidă”, *Grabar, Unle*, 1956). Pe gel de agar beta-globulinele nu conțin lipide.

Fracțiunile lipoproteice, obținute prin electroforeză pe hirtie, se potrivesc bine cu cele ale ultracentrifugării și precipitării saline. LP-le beta se precipită cu fracțiunile I+III, iar la ultracentrifugare se flotează ca LPDR, împreună cu chilomicronii. Ele conțin 70% din cantitatea colesterolului și 50—60% din aceea a fosfatidelor totale. Alfa-LP-le fracțiunilor IV+V+VI sînt pe baza flotației lor LPDM, conținind 30% din cantitatea totală de colesterol, și 40—50% din aceea a fosfatidelor plasmaticice. Mobilitatea lor diferită pe gel de agar este explicabilă printr-o oarecare modificare de structură (disociere, schimbare de încărcare electrică, *Pézold*, 1957). Acest fenomen apare și la ultracentrifugare într-un mediu de înaltă densitate: cantitatea alfa-1-LP-lor crește în dauna fracțiunii beta lipoproteice. Date recente arată că e foarte probabil ca diferențele calitative între cele două fracțiuni lipoproteice exceptind partea proteică să se datorească în primul rînd conținutului lor diferit în grăsimi neutre, deoarece acestea influențează în cea mai mare măsură densitatea și mobilitatea electroforetică.

Natura legăturii ce există între lipide și proteine nu este încă astăzi cunoscută. Un fapt este totuși sigur, anume că această legătură este foarte lăbilă, ceea ce poate explica marea variabilitate a proprietăților fizico-chimice ale LP-lor (migrație electroforetică, flotație etc.). În legătura dintre proteine și lipide pot participa toate formele cunoscute ale forțelor interparticulare (valență ionică, valențe secundare). O parte a acestei legături se desface și la o acțiune relativ slabă (acțiunea hiparinei, alcoolului, săpunurilor, etc.). Pe baza acestora unii cred că LP-le obținute din plasmă sînt pînă în prezent numai produse artificiale. LP-le plasmaticice propriu zise au un alt caracter. Astfel problema existenței adevărate a LP-lor plasmaticice nu e încă rezolvată, cu toate că în literatura recentă găsim mai multe date care pledează pentru existența lor.

Datorită acestor date recente, azi cunoaștem destul de bine forma și dimensiunile LP-lor. În urma analizelor electromicroscopice s-a dovedit că ele au o structură macromoleculară-micromicelară prezentând în general o formă globulară, cu un diametru de la cîțiva milimicromi pînă la 15—20 milimicromi. Aceste din urmă sînt denumite de unii autori *lipomicroni* spre deosebire de *chilomicroni* care nu au proteine. Conținutul lor în proteină este diferit, în cazul Alfa-1-LP-lor fiind de cca 30% (acest fapt cauzează densitatea lor mare), iar cel al beta-LP-lor nu depășește valoarea de 20%. Aminoacidul N-terminal al LP-lor alfa-1 este acidul aspartic, iar al celor din urmă e acidul glutamic.

Lipoproteinele izolate sînt instabile, în primul rînd sensibile la oxidare. Labilitatea beta-LP-lor este deosebit de accentuată. E suficientă o diluare cu soluție izotonică de NaCl pentru a se produce denaturarea și precipitarea lor ireversibilă. În stabilirea lor, probabil are un rol oarecare formarea in vivo a complexelor hofile cu proteine plasmatic.

Trebuie remarcată stabilitatea relativă a LP-lor față de fermenții proteolitici clasici (pepsină, tripsină). Totuși există unii fermenți care au o acțiune litică specifică asupra lor, ca de exemplu lecitinaza (Hortick 1954; Spitzer 1956) precum și lipoprotein-lipazele tisulare. Denumirea acestor fermenți arată că acțiunea lor esterazică nu atinge decît lipidele legate de proteine. Rolul ce le revine ar putea fi introducerea proceselor de mobilizare sau de fixare a lipidelor depozitate, adică transportate (Korn 1955—56).

În ceea ce privește originea LP-lor se acceptă în general ipoteza că chilomicronii alimentari se combină treptat în plasmă cu proteinele, transformîndu-se în LP-e. Experimentele cu izotopi arată că timpul de scindare a fracțiunilor LP-ce diferă în mod caracteristic: în cazul chilomicronilor el este de 1—2 ore, la LP-ele beta e abia de 2—3 ori mai mare, LP-le alfa-1 arată un interval de 4—12 zile. E foarte probabil deci că fracțiunile LP-ce se transformă unele în altele. Majoritatea chilomicronilor ies repede din circulație, prin peretele capilarelor o cantitate mai mică a lor se leagă la beta-globuline, care pierzînd o bună parte din cantitatea lor se transformă repede în alfa-1-LP-e, acestea conținînd mai multe proteine și avînd o densitate mai mare. Proporția relativ stabilă între fracțiunile LP-ce ale plasmii se poate explica printr-un echilibru dinamic complicat între ficat și alte țesuturi pe de o parte, și plasma sanguină, pe de altă parte.

Aici trebuie să subliniem faptul că LP-le nu sînt numai substanțe pasive de transport. Astăzi se cunosc mai multe acțiuni biologice bine definite ale lor. Ele participă nu numai în reacțiile imunologice ci au un rol important atît în coagularea sîngelui cît și în acționarea funcționării unor fermenți. LP-le alfa-1 activează lipoprotein-lipaza (Korn 1956). LP-le beta inhibă folosirea glucozei de către mușchii scheletici și în acest sens apar ca antagoniști de insulină. (Bernstein 1956). Încă nu cunoaștem ce relații există între acest fenomen și hiperlipemia diabeticilor.

#### *Reglarea lipoproteinemiei și factorii care o influențează :*

Hahn a observat în 1953 că lipemia alimentară dispăre în cîteva minute după ce se administrează heparină. S-a dovedit ulterior că în cursul acestui fenomen conținutul plasmei în lipide nu se modifică (Zöllner, 1952). Așadar dispariția lipemiei vizibile este un proces fizico-chimic, fiind cauzat sau de producerea LP-lor hofile sau de modificarea gradului de dispersitate a lipidelor sub influența unei substanțe, care activează capilarele. Prin ultracentrifugare s-a demonstrat într-adevăr că, sub influența heparinei din LPDR macromoleculare, apar LPDM cu o greutate moleculară mai mică. Acest fenomen s-a manifestat la electrolize în modificarea mobilității.

Clarificarea lipemiei se desfășoară în două faze. La început din anumite proteine ale plasmei și dintr-o substanță care se găsește mai ales în țesuturi și organe bogate în elemente musculare nielude, se produce un factor de clarificare a lipemiei (FCL). (Factorul tisular este probabil identic cu LP-lipaza lui Korn). Sub acțiunea FCL plasma lipemică devine clară. A doua fază de clarificare propriu-zisă este reversibilă: poate fi suspendată prin inhibarea heparinei (de ex. cu proțamină). Acțiunea de clarificare poate fi provocată și de doze mici de heparină, care nu au încă nici o influență asupra coagulării sîngelui (Seitz, Zöllner 1955). Grăsimile emulsionate prin intervenția heparinei pă-

răsesc ușor plasma: rolul acestui proces în depozitarea și mobilizarea lipidelor are o mare importanță.

*Lipoidemia și modificările fiziologice și patologice ale fracțiunilor LP-ce.* Lipidemia fiziologică între limitele dependenței de vîrstă, sex și ale factorilor endocринi și alimentari, este destul de stabilă. Paralel cu vîrsta se ridică ușor, apoi scade. Lipidemia feminină pînă la cca 45 ani este sub nivelul bărbaților de aceeași vîrstă, pînă la 50 ani arată în general valori egale, pentru ca mai tîrziu să crească. Diferențe similare pot fi puse în evidență și în domeniul LP-lor din punct de vedere calitativ și cantitativ. Cantitatea LP-lor beta la femeile tinere arată un nivel sensibil scăzut, față de acela al bărbaților de aceeași vîrstă, care este identic cu cel al femeilor în vîrstă de 34—50 de ani. S-au obținut rezultate analoage prin ultracentrifugare și prin examinări chimice preparative. Sînt importante și diferențele referitoare la conținutul în fosfolipide al fracțiunilor LP-ce. În afară de o colesterolemie identică, LP-le beta ale bărbaților în vîrstă conțin o cantitate mai mare de colesterol față de beta-LP-le femeilor de aceeași vîrstă, iar la femeile tinere conținutul relativ de colesterol al LP-lor alfa-1 este mai mare. *Block* a dovedit că lipemia alimentară apare mai accentuată la bărbați ca la femei, iar acțiunea de clarificare a heparinei administrată i. v. este mai redusă.

Lipidemia normală relativ stabilă rezulta dintr-un echilibru dinamic între importul de grăsimi și sinteza, precum și între degradarea și depozitarea lipidelor. Acest echilibru dinamic se realizează și menține sub acțiunea unui mecanism central (neural și endocrin) bine definit. S-a dovedit că în urma analizelor electroencefalografice, după o scădere inițială, apare hiperlipemia. Excitația patologică a sistemului neuro-vegetativ este urmată, în general, de o hiperlipemie (de ex. miocardic). Se observă o schimbare a lipidemiei și în cursul ciclului menstrual. În graviditate există o hiperlipemie cu devierea proporției LP-lor alfa-1/beta.

În metabolismul lipidic joacă un rol important și plămîni. Conținutul în lipide al sîngelui care trece prin plămîni provoacă scăderea numărului chlolesterolilor. După o hiperlipemie alimentară conținutul lipidic al plămînilor crește considerabil.

Ficatul, depozitele lipidice și LP-le constituie punctul de atac al sistemului de reglare. Mecanismul exact al reglării nu se cunoaște încă. Rolul factorilor endocринi este evident, fapt dovedit și de devierile lipoproteinemiei care însoțesc diferitele tulburări endocrine. Este foarte probabil că mobilizarea lipidelor depozitate stă sub influența factorilor endocринi. În acest sens acționează ACTH-ul, STH-ul, corticosteronii și tiroxina. Insulina are un efect contrar, ea favorizează atât transformarea glucidelor în lipide cît și depozitarea lor.

Din preparate extrem de pure de ACTH s-a putut izola o substanță, sub influența căreia se produce mobilizarea depozitelor lipidice. Dată fiind acțiunea ce o exercită a fost numită *adipokinază*. Se poate presupune că ea ar favoriza și oxidația acizilor grași. Probabil că există o legătură strînsă între aceasta substanță și factorul lipomobilizator (FLM, *Steiger*), care a fost izolat din plasmă umană și animală. FLM s-a putut cristaliza și s-a dovedit a fi o peptidă termostabilă, care administrată pe cale parenterală, produce hiperlipemie, iar în doze repetate, diminuează depozitele lipidice, fără degenerarea lipidică a ficatului.

Administrîndu-se în prealabil cortison, cantitatea ei în plasmă se poate mări de o mie de ori (la animalele hipofizectomizate aceste fenomene nu apar). În doze de 0,25—1,0 mg nu are nici un efect periculos asupra organismului uman și există indicii că va fi utilizată în tratamentul obezității.

Acțiunea sistemului hipofizo-suprarenal asupra metabolismului lipidic este dovedită de numeroase experiențe de laborator: administrarea extractelor lobului anterior mărește conținutul lipidic al ficatului la animalele de experiență și produce cetonurie. La șobolani, transplantarea de glande suprarenale, sau administrarea cortisonului produce hipercolesterolemie. S-a constatat că hidrocortisonul favorizează intrarea acetatului marcat cu  $C^{14}$ , precum și sinteza lipidelor, în peretele aortei (*Werthessen*). Hipercolesterolemia și repartiția patologică a lipidelor pot fi suspendate prin adrenalectomie. Printre simptomele adrenalectomiei clasice nu au existat modificări lipoproteinemice, fiindcă animalele au suferit înainte de apariția acestor fenomene. Cu ajutorul metodelor moderne (tratament de substituție, electroliți) animalele suprarenalectomizate pot fi menținute în viață timp îndelungat. S-a dovedit că de ex. la cîini, în urma supra-

renalectomiei, depozitele lipidice scad și apare hiperlipemia, însă cantitatea de colesterol și fosfolipide din plasmă se micșorează considerabil. Diminuarea depozitelor lipidice poate fi inhibată prin administrare de cortison.

În ceea ce privește rolul tiroidei, nivelul scăzut al colesterolului din sânge este un simptom de mult observat în hipertireoză. Gradul hipocolesterolemiei nu este însă în concordanță cu gravitatea bolii. Mixedemul se caracterizează printr-o colesterolemie, a cărei modificare marchează fidel eficacitatea tratamentului de substituție. După *Golman* în mixedem crește fracțiunea S10—20 a plasmei.

Hormonii sexuali influențează în mod considerabil metabolismul lipidic și lipo-proteinemia. Efectul lor asupra colesterolemiei se manifestă printr-un antagonism accentuat între androgeni și estrogeni: primii micșorează, iar cei din urmă măresc colesterolemia. Hipercolesterolemia alimentară a anumitor păsări este diminuată în mod considerabil prin administrarea de stilbestrol, substanța care inhibă și formarea ateromatozei consecutive. *Berezin* a dovedit că această acțiune se observă numai în cazul cînd hipercolesterolemia se manifestă în prealabil.

Pe de altă parte hormonii androgeni măresc lipidemia și colesterolemia, stimulînd creșterea LP-ilor beta și cauzînd prin aceasta apariția constelației favorizante manifestării clinice a ateromatozei.

*Schimbările fracțiunilor LP-ce ale plasmei în unele procese patologice* astăzi sînt destul de bine cunoscute, mai ales în arterioscleroză, cu toate că rezultatele analizelor nu au corespuns decît în parte așteptărilor. Deși s-a dovedit că în arterioscleroză apare frecvent atît hiperlipemia cît și diminuarea LP-ilor alfa-1, totuși acest fenomen nu este specific și nu constituie nici decum un indiciu al gravității bolii. Din punct de vedere al diagnosticului diferențial e foarte important faptul că în endarterita obliterantă nu se observă devierea proporției fracțiunilor LP-ce.

În cursul unor procese patologice, LP-le plasmei reacționează prin deviere proporției LP-ilor alfa-1 beta. Acest fenomen ce se produce în iavaoara LP-ilor beta se observă în hepatita acută, în ciroza hepatică, în majoritatea bolilor endocrine (diabet zaharat, boala lui Cushing, etc.), precum și în lipidozele sistematice, aparținînd tesaurizmozilor.

În inflamațiile acute se observă un fenomen asemănător. Aceeași constatare am făcut-o și noi în cazurile de silicoză umană și experimentală. În cursul tratamentului cu acid silicic la animalele de experiență se produce și o hiperlipemie pasajeră.

În faza actuală a hepatitei cronice și în ciroză augmentarea LP-ilor alfa-1 se consideră drept un simptom concludent. Recent, în icterul mecanic s-a dovedit prezența în plasmă a LP-ilor caracteristice. Analiza electroforetică a arătat că mobilitatea lor este identică cu cea a LP-ilor beta, o parte din ele se precipită cu fracțiunea IV + V — VI al lui *Cohn*, iar la ultracentrifugare sînt LPDR. În ciuda acestui fapt proporția conținutului lor de colesterol (fosfatida este mai mică decît 1.). Conținutul lor în proteină, față de LPDR propriu-zise este mai redus, indicînd și anumite diferențe imunobiologice. După rezolvarea obturației dispar din plasmă. Probabil că deosebirea ce există între proprietățile lor se explică prin acțiunea emulsionantă a acizilor coleici augmentați în plasmă.

Comportarea LP-ilor plasmatice în inflamațiile cronice este diferită.

În poliartrita cronică de ex. cantitatea LP-ilor beta scade. Această deviere este r. ai accentuată în sindromul nefrotic. Marca stabilitate a LP-ilor alfa-1 în nefroze este explicabilă prin formarea complexelor cu fracțiunea mucoproteinică alfa-2 a plasmei. În tumorile maligne, lipidemia de obicei scade, proporția fracțiunilor LP-ice rămîne nemodificată, iar în unele cazuri se observă diminuarea LP-ilor alfa-1. Sînt mai ales cunoscute proprietățile, compoziția și conținutul în lipide ale paraproteinelor mielomice. S-a stabilit că paraproteinele conțin în general mai multe mucopolizaharide și mai puține lipide decît proteinele normale.

Din toate acestea reiese că în urma cercetărilor efectuate în ultimii ani analiza lipidelor și LP-ilor plasmei are drept rezultat numeroase cunoștințe prețioase. Problemele nerezolvate încă trebuie lămurite în viitor prin cercetări aprofundate.

*Sosit la redacție: 23. I. 1959.*

*Bibliografia la autor.*